

Programa de Doctorado 290F. Obstetricia y Ginecología



Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología



**“EVALUACIÓN DEL PAPEL TERAPÉUTICO DE LA
INHIBICIÓN DEL PAI EN EL TRATAMIENTO DE
LA ENDOMETRIOSIS EN UN MODELO ANIMAL
MURINO HOMÓLOGO”**

Tesis doctoral presentada por:
Ana Moreno Collado, Licenciada en Medicina

Director de tesis:
Profesor Antonio Pellicer Martínez

Co-Director:
Dr. Raúl Gómez Gallego

Valencia, 2015

Antonio Pellicer Martínez, Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Raúl Gómez Gallego, Doctor por la Universidad de Valencia e Investigador Postdoctoral del Programa Miguel Servet en el instituto Universitario IVI/INCLIVA.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: “Evaluación del papel terapéutico de la inhibición del PAI en el tratamiento de la endometriosis en un modelo animal murino homólogo” ha sido realizado por Dña. Ana Moreno Collado bajo su supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia a 12 de Octubre de 2015.

Director	Co-Director	Doctorando
A.Pellicer Martínez	R. Gómez Gallego	A. Moreno Collado

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer al profesor Pellicer su confianza en mí ofreciéndome la oportunidad de participar en este grupo de trabajo de Endometriosis, en el que he estado trabajando durante 4 años, y gracias al cual he tenido la posibilidad de realizar esta tesis. Es admirable tu afán investigador y tu talento para crear excelentes equipos. Gracias por tu apoyo incondicional a la actividad investigadora y a los médicos jóvenes, por alentarnos a mejorar y abrirnos el camino para conseguir nuestros objetivos.

En segundo lugar quisiera dar mi más profundo agradecimiento al Dr. Raúl Gómez: investigador incansable, brillante científico y mejor persona. Gracias a tu tesón, tu rigor científico y tus consejos he conseguido acabar esta tesis. Mil gracias porque sin ti no lo habría conseguido.

Gracias también a Anna Buigues por su inestimable ayuda con el análisis de los datos y por su cercanía y calidad humana. Gracias por tu paciencia conmigo y por estar ahí cuando te he necesitado.

Y gracias en general a todo el equipo de trabajo de Endometriosis de La Fe: Irene, Paula, Vicente, Toni... que me han acompañado y animado durante estos años, en especial a Jessica:

gracias por tus ánimos y por prestarme tu ayuda desinteresadamente, ¡eres encantadora!

También quiero dar las gracias a dos personitas que no estaban cuando empecé en este grupo de trabajo y que ahora forman, junto con mi marido uno de los pilares más importantes de mi vida, que son mis hijos Alicia y Roger. Gracias a Jose por estar a mi lado SIEMPRE, ayudándome y apoyándome en todo, y por cuidar de los niños todas las veces que yo no he podido. Y por último gracias también a mi familia, por facilitarnos a los dos el camino de ser padres y trabajadores enamorados de nuestra profesión.

A todos, ¡GRACIAS!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
1.-INTRODUCCIÓN	17
1.1 Situación actual de la endometriosis	18
1.1.1 Concepto y generalidades	19
1.1.2 Evolución y desarrollo de la enfermedad	20
1.1.3 Epidemiología	22
1.1.4 Etiopatogenia	22
a) implantación por menstruación retrógrada	
b) la metaplasia celómica	
c) el trasplante mecánico	
d) la difusión hematógena y linfática	
e) los restos embrionarios	
f) alteraciones del sistema inmunológico	
1.1.5 Clasificación	27
1.1.6 Diagnóstico	30
a) criterios clínicos	
b) exploración física	
c) técnicas diagnósticas no invasivas	
d) técnicas invasivas: Cirugía laparoscópica	
e) biomarcadores	

1.1.7 Tratamiento	34
1.1.7.1 tratamiento quirúrgico	34
1.1.7.2 tratamiento farmacológico	36
1.1.7.2.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)	37
1.1.7.2.2 Tratamiento Hormonal clásico:	38
-Anticonceptivos orales combinados (ACO)	
-Análogos de la GnRH	
- Gestágenos	
- Danazol	
- Gestrinona	
1.1.7.3 Nuevas terapias en el tratamiento de la endometriosis	42
a) Tratamientos hormonales experimentales	
a.1) Antagonistas de la GnRH	
a.2) Inhibidores de la aromatasa	
a.3) Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMS)	
a.4) Moduladores selectivos de los receptores de progesterona (SRPMs)	
b) Tratamientos No hormonales	
b.1) Fármacos hipolipemiantes	
b.2) Bifosfonatos	
b.3) Fármacos inmunomoduladores	
b.4) Bloqueantes del Factor Nuclear KappaB (FN-kB)	

b.5) Terapias antiangiogénicas:

*b.5.1) Inhibidores selectivos de la COX-2:
celecoxib*

b.5.2) Té verde

b.5.3) Agonistas dopaminérgicos (quinagolida)

1.2 El sistema fibrinolítico	58
1.2.1 Aspectos generales de la fibrinólisis	58
1.2.2 Plasminógeno y plasmina	61
1.2.3 Activadores fibrinolíticos	63
1.2.3.1 Activador tisular del plasminógeno (tPA)	
1.2.3.2 Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)	
1.2.4 Inhibidores fibrinolíticos	66
1.2.4.1 Inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1)	
1.2.5 El sistema fibrinolítico en la endometriosis	67
1. 2. 5. 1 Tejido endometriósico	
1. 2. 5. 2 Líquido peritoneal	
1.3 Inhibidores farmacológicos del PAI-1	72
1.3.1 Inhibidores de uso clínico	73
1.3.2 Inhibidores en desarrollo	75
1.4 Modelos animales para el estudio de la endometriosis	79
1.4.1 modelos murinos heterólogos	80
1.4.2 modelos murinos homólogos	82

1.5 Justificación del uso de modelo homólogo y de PAI-039 para evaluar el papel de inhibición del PAI en endometriosis en el presente trabajo	84
2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO	87
3.- OBJETIVOS	91
4.- MATERIAL Y MÉTODOS	95
4.1 Marcaje celular mediante adenovirus recombinante	98
4.1.1 Amplificación del adenovirus recombinante Ad-mCherry	102
4.1.2 Determinación de la concentración de partículas víricas infectivas	103
4.2 Experimentación animal	104
4.2.1 Obtención de tejido endometrial “menstruante” de ratonas donantes	106
4.2.2 Marcaje del tejido endometrial “menstruante”	109
4.2.3 Trasplante del tejido endometrial “menstruante” a las ratonas receptoras	109
4.2.4 Monitorización de la fluorescencia	110
4.2.5 Tratamiento con inhibidor de PAI-1	110
4.2.6 Sacrificio y recogida de muestras	111

4.3 Análisis histológicos	111
4.3.1 Inclusión en parafina	111
4.3.2 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en parafina	112
4.4 Tinción tricrómica	122
4.5 Análisis apoptosis	123
4.6 Cuantificación	127
4.7 Concentración de PAI-1 activo y PAI-1 total en plasma	127
4.8 Análisis estadístico	131
 5.- RESULTADOS	 133
5.1 Modelo de endometriosis	135
5.2 Evaluación del efecto de la inhibición de PAI-1 en el tamaño de las lesiones endometriósicas	137
5.3 Caracterización de las lesiones endometriósicas	144
5.4 Cuantificación fibrinolisis	147
5.5 Mecanismo responsable de la disminución del tamaño	149
 6.- DISCUSIÓN	 157
 7.- CONCLUSIONES	 179
 8.- BIBLIOGRAFÍA	 183

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

ACO: Anticonceptivos Combinados Orales

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AEM: Agencia Estatal del Medicamento

AFS: American Fertility Society

AGGF1: Angiogenic factor with G patch and FHA domains

AINE: Antiinflamatorio No Esteroideo

ARN: Ácido Ribonucleico

AS- IV: Saponin astrogalosido IV

ASRM: American Society of Reproductive Medicine

FN-kB: Bloqueantes del Factor Nuclear KappaB

BHCG: Gonadotropina Coriónica Humana

BSA: Albúmina Sérica Bovina

°C: Grados centígrados

Cb2: Cabergolina

CCL2: Quimioquina Ligando 2

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

CFP: Cyan Fluorescent Protein

COX-2: Ciclooxygenasa 2

CXCL10: C-X-C motif chemokine

DA: Dopamina

DAB: Diaminobenzamida

DOPA: Dihidroxifenilalanina

DrD2: Receptor tipo 2 de la Dopamina

E1: Estrona 1

EGCG: Epigallocatequina galato

EMA: European Medicines Agency

EPA: Ácido Eicosapentaenoico

ESHRE: European Society of Human Reproduction and Embriology

FN-KB: Factor Nuclear KappaB

FSH: Hormona folículo estimulante

GFP: Green Fluorescent Protein

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

h: Hora

HMG-CoA: 3 hidroxil-3-metilglutaril-coenzima A

HMW uPA: Activador de uPA o uroquinasa de alto peso molecular

HRP: Peroxidasa de rábano

IL-6: Interleuquina 6

IL-Beta: Interleuquina-Beta

LBS: Lysine binding sites (lugares de unión a la lisina)

LH: Hormona luteinizante

LMW uPA: Activador de uPA de bajo peso molecular

MEC: Matriz extracelular

MIF: Factor Inhibidor de la migración de macrófagos

min: Minutos

MIP-1 α : Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha

MIP-2: MacrophageInflammatory Protein2

MMP: Metaloproteasa matriz celular

MMP13, MMP10, MMP8: Metaloproteasas de la MEC 13, 10, 8

NK: Natural killer

NU: Nude o atímico

NOD-SCID: Non-obese diabetic severe combined immunodeficient

NR1: Notoginsenosido R1

PAIs. Inhibidores de los activadores del plasminógeno

PAI-1, 2 y 3: Inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1, de tipo 2 y de tipo 3

PBS: Phosphate Buffered Saline (tampón fosfato salino: 0,01M, ph 7,4, NaCl 0,14M)

PCI: Inhibidor de la proteína C activada

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDF: productos de degradación de la fibrina

PDTC: Pirridolina Ditiocarbamato

PFA: Paraformaldehído

PGE2: Prostaglandina E2

PRL: Prolactina

RM: Resonancia Magnética

RT: Transcripción reversa

RUNX1: Runt-related transcription factor 1

SAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

SCID: Severe combined immunodeficient

scu-PA: Activador de uPA de una cadena

SERMs: Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos

SHO: Síndrome de Hiperestimulación Ovárica

sICAM: Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1

SPRMs: Moduladores Selectivos de los Receptores de Progesterona

TA: Temperatura ambiente

TBST: Tris-buffered saline and tween 20

tcu-PA: Activador de uPA de doble cadena ó (HMW-uPA)

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha.

tPA: Activador tisular del plasminógeno

uPA: Activador del plasminógeno tipo uroquinasa

uPAR: Receptor de uPA

su-PAR: Forma soluble de uPAR

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de crecimiento del endotelio Vascular)

VEGFR2: Receptor tipo 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular

VEGF-A: Factor de Crecimiento del endotelio vascular tipo A

YFP: Yellow Fluorescent Protein

1.- INTRODUCCION

1.1- Situación actual de la endometriosis

1.1.1 Concepto y generalidades

La primera mención histórica que se hizo sobre la patología posteriormente conocida como endometriosis fue en 1880 por el anatomopatólogo austriaco Von Rokitanski (Rokitansky, 1860), a la que siguieron en 1896 otros autores como Von Recklinghausen (Speroff y cols, 1999). No fue sin embargo hasta 1921 cuando el médico norteamericano John Albertson Sampson, acuñó el termino de “endometriosis” para describir las *lesiones peritoneales* que consideró *siembras procedentes de enfermedad en el ovario* (Sampson, 1921), desarrollando más tarde su teoría de la “menstruación retrógrada” como la posible causa de esta enfermedad (Sampson, 1927), y tras la cual han seguido numerosos estudios dirigidos al conocimiento de la misma.

En virtud de la información recogida de estos estudios a lo largo de los últimos años, actualmente se define la endometriosis como la presencia de endometrio ectópico (glándulas y estroma endometrial funcionales) fuera de la cavidad uterina. Se trata pues de una patología benigna, pero invasiva, que tiende a la progresión y a la recidiva, planteando problemas difíciles de manejo terapéutico.

Se ha descrito endometriosis en múltiples localizaciones: fundamentalmente puede aparecer en cualquier parte del **aparato genital**, aunque también **extragenitalmente** (en ligamentos anchos, redondos, uterosacros, fondos de saco vesicouterinos, espacio de

Douglas y tabique rectovaginal (Dmowski y cols, 1984) y de manera ocasional **extrapélvica** (como intestino, vejiga,...) e incluso extraperitoneal (pericardio, pleura,..) (Jenkins y cols, 1986). La localización más frecuente es en ovario, de manera bilateral y en peritoneo, fundamentalmente sobre ligamentos uterosacros, espacio de Douglas y plica vesicouterina (Calderay y cols, 2003).

1.1.2 Evolución y desarrollo de la enfermedad

Debido al origen endometrial de las lesiones, la endometriosis es una enfermedad **estrógeno-dependiente** en la que las lesiones sufren un proceso de crecimiento asociado a las variaciones cíclicas del estradiol durante el ciclo menstrual. A su vez los implantes endometriósicos presentan una superproducción local de estrógenos. Las lesiones generan así mismo un exceso de prostaglandina a través de la transcripción de la enzima COX-2 que cataliza su síntesis. Junto a las prostaglandinas, la liberación local de TNF y otras citoquinas genera un ambiente proinflamatorio y con potente actividad angiogénica que a su vez potencia la actividad aromatasa y con ello la producción local de estradiol en un ciclo de retroalimentación positiva con resultado de proliferación y crecimiento del implante y dolor asociado al proceso (Bulun 2000; Serafini, 2011). Esta fuerte dependencia a los estrógenos que mantiene a la enfermedad activa durante toda la vida fértil de la mujer es la razón por la que se ve mermada con la llegada de la menopausia, de aquí que la base de los tratamientos actualmente vigentes sea el bloquear la actividad

estrógenica produciendo un estado de “pseudomenopausia” o “menopausia like”.

Además del ambiente estrógeno, otro factor importante para el desarrollo de las lesiones es la generación de nuevos vasos sanguíneos alrededor del tejido patológico promovido por factores **angiogénicos**. De las múltiples teorías que intentan explicar la etiopatogenia de la endometriosis, y que comentaremos más adelante, la más aceptada es la de la menstruación retrógrada, propuesta por Sampson en 1927 (Sampson, 1927). El tejido endometrial retrogrado que se desprende durante la menstruación, según esta teoría, precisa de un aporte sanguíneo efectivo que lo nutra de los componentes que permiten su crecimiento. La neoangiogénesis es por tanto un requisito esencial para el desarrollo de la endometriosis como avalan numerosos estudios (McLaren J y cols 2000; Nap y cols, 2004; Lasche y Menger, 2007; Nisolle y cols, 1993...).

Aunque la endometriosis es una enfermedad benigna posee un comportamiento en muchos aspectos similar al cáncer tendiendo a la **progresión** y al **empeoramiento** con el paso del tiempo. De manera análoga a la progresión tumoral, se produce un proceso de implantación e invasión de tejidos sanos previa destrucción de la matriz extracelular, en la que además del ambiente estrogénico y la formación de neovasos ya comentado, parece estar también implicado el sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas como se ha evidenciado en diversos estudios en los que profundizaremos más adelante (Gilabert-Estellés y cols 2007; Gomez y cols 2011).

1.1.3 Epidemiología

La endometriosis afecta del 3-10% de mujeres en edad reproductiva (Cramer y Missmer, 2002) aunque la incidencia real es desconocida pues esta enfermedad se desarrolla de forma asintomática hasta en el 50% de los casos, apareciendo como hallazgo casual en el transcurso de cirugías realizadas por otros motivos. Así pues, se han descrito prevalencias de entre el 4 al 15% en mujeres asintomáticas sometidas a esterilización tubárica (Strathy JH y cols, 1982; Mahmood TA y cols, 1991; Sangi-Haghpeykar H y cols, 1995; Barbieri, 1990). Basándonos en esto, ya existen estudios que sugieren una prevalencia de hasta el 32% en mujeres asintomáticas (Matorras y cols, 2001).

La edad al diagnóstico varía entre los 25 y los 30 años (Kuohung y cols, 2002). En mujeres con infertilidad está presente en más del 50% y entre el 50 y el 60% de las mujeres y adolescentes con dismenorrea severa o dolor pélvico crónico (Bullock JL y cols, 1974; Goldstein DP y cols, 1980; Eskenazi B y cols 1997).

También se han descrito diferencias en la distribución étnica siendo más prevalente en mujeres de raza negra y menos en las orientales respecto de la raza caucásica (Hasson HM, 1976; Sangi-Haghpeykar H y cols, 1995).

1.1.4 Etiopatogenia

Se han formulado numerosas teorías para tratar de explicar la génesis de esta enfermedad siendo sin embargo, su etiología y

patogenia todavía no conocidas en su totalidad. Las teorías propuestas no son excluyentes entre sí ni explican por completo todos los casos, por lo que muy probablemente la endometriosis pudiera tener un origen multifactorial, en el que además de factores genéticos (Treloar, 2005; Daftary 2004), podrían intervenir el estrés oxidativo (Kajihara, 2011; Ngo, 2009), y la exposición a tóxicos ambientales (Rier, 2003). Las teorías descritas hasta el momento se resumen a continuación:

a) Implantación por menstruación retrógrada

La teoría propone la existencia de un reflujo de tejido endometrial durante la menstruación a través de las trompas de Falopio hacia la cavidad abdominal, donde puede llegar a implantarse (Sampson JA y col, 1927 y 1940).

Varias observaciones apoyan esta teoría: La localización peritoneal de las lesiones endometriósicas corresponde con las porciones pendientes de la pelvis, que están en contacto con un mayor reflujo tubárico, fundamentalmente ovarios, espacio de Douglas y ligamentos uterosacros (Hoshiai H y cols, 1993; Vercellini P y cols, 1998; Jenkins y cols, 1986. La endometriosis es más prevalente en las mujeres con obstrucción congénita del tracto de salida al flujo menstrual (Sanfilippo y cols, 1986) frente a aquellas que presentan malformaciones müllerianas no obstructivas. Además, se ha demostrado en cultivos celulares la viabilidad del endometrio del flujo menstrual en líquido peritoneal, con capacidad de implantación y crecimiento (Keetel y Stein, 1951; Koks y cols 1997). También se ha logrado inducir la endometriosis en experimentos animales mediante

fístulas uteropélvicas artificiales (Te Linde y Scott, 1950) o forzando un flujo menstrual retrógrado al crear una obstrucción anterógrada (D'Hooghe y cols, 1995). En 1999, Witz y su equipo demostró la capacidad del endometrio de adherirse a la superficie mesotelial del peritoneo (Witz y cols, 1999).

Esta teoría, sin embargo, deja por explicar otros aspectos de la enfermedad, como el hecho de que, siendo la menstruación retrógrada un proceso prácticamente universal, la endometriosis se desarrolle en tan sólo un pequeño porcentaje de la población general (Evers y cols, 1995). La cuestión aquí sería encontrar la causa de porqué hay mujeres que no son capaces de eliminar estos restos de endometrio generando su implantación y desarrollando la enfermedad.

b) La metaplasia celómica

Sugiere que un epitelio con capacidad proliferativa, como es el epitelio ovárico o la serosa peritoneal, puede transformarse por metaplasia en tejido endometrial (Cullen TS y cols, 1896; Meyer R y cols, 1903) tras ser inducidos por estímulos inflamatorios o endocrinos. Está basada en el hecho de que casi la totalidad del epitelio genital representa distintos grados de diferenciación del epitelio celómico, de aquí su alta capacidad de diferenciarse frente a estímulos externos. Esta teoría explicaría la aparición de endometriosis en cualquier lugar de la cavidad peritoneal y de la pleura (Foster y cols, 1981; Elliot y cols, 1985; Honore, 1999) y los casos raros de endometriosis encontrados en ausencia de menstruación (El Mahgoub y cols, 1980; Honore 1999). Sin embargo, ni esta teoría,

ni la de la implantación, pueden explicar la aparición de tejido endometrial a nivel umbilical (Blumenthal, 1981; Michowitz y cols, 1983) o pleural (Wilkins y cols 1985).

c) Alteraciones del sistema inmunológico

Estudios en monos Rhesus a quien se les suprimió el **sistema inmune**, desarrollaron más frecuentemente endometriosis que el grupo control (Wood y cols, 1983); a partir de este hallazgo otros estudios posteriores (Tasaku, 2001; Hill y cols, 1988, Mathur y cols, 1982; Oosterlynck y cols,1991) han ido apoyando la asociación entre endometriosis y alteraciones del sistema inmunológico.

Esta teoría explicaría el porqué a pesar de que más del 90% de mujeres presentan menstruación retrógrada sólo un pequeño porcentaje desarrolla la enfermedad: serían aquellas que tienen alguna disfunción inmunitaria que impediría el aclaramiento normal de las células endometriales promoviendo su adhesión e invasión, neoangiogénesis y la inervación sensorial, con la consecuente progresión de la enfermedad (Falcone y Lebovic, 2011).

Si bien esta teoría explica el posterior desarrollo de la enfermedad, no explica sin embargo el origen del tejido endometrial formador de lesiones en localizaciones donde el endometrio no está presente, requiriendo de otras teorías que la complementen.

d) El trasplante mecánico

La causa más probable de la aparición de endometriosis en cicatrices quirúrgicas y periné sería el trasplante directo inadvertido de tejido endometrial en el momento de una cirugía pélvica, cesárea o reparación de episiotomía (Taff y cols, 2001).

A favor de esta teoría tenemos diversos estudios que describen la aparición de lesiones endometriósicas en episiotomías (Hambrick E, 1979), postcesáreas (Stroup PE, 1976) e incluso posthisterectomías vaginales (Schmid HH, 1961) de mujeres afectas de endometriosis. Sin embargo esta teoría no podría explicar la aparición de endometriosis en pacientes sin antecedentes quirúrgicos.

e) La difusión hematógica y linfática

Existe una extensa comunicación linfática entre todos los órganos de la pelvis. La difusión linfática y hematógica de células endometriósicas puede representar otra vía por la que se diseminen e implanten focos a distancia, explicando así las localizaciones retro y extraperitoneales (Halban, 1924 y 1925).

La diseminación hematógica fue demostrada experimentalmente en 1940 inyectando por vía intravenosa endometrio en conejos y obteniendo como resultado una endometriosis pulmonar (Javert, 1949)

Esta teoría sería complementaria de las anteriores ya que no explicaría la generación inicial del implante, sino su diseminación.

f) Los restos embrionarios

Von Recklinghausen en 1896 propone esta teoría no documentada basada en que el sistema del conducto de Wolf en desarrollo puede dejar tras de sí pequeños grupos o restos de células que tienen capacidad de desarrollar tejido endometrial funcionante.

Esta teoría sin embargo no explicaría la generación de endometriosis en lugares extraabdominales como la cavidad torácica (Alifano M y cols, 2007; Joseph J y cols 1994).

1.1.5 Clasificación

La clasificación más aceptada y utilizada mundialmente es la de la American Society of Reproductive Medicine (ASRM) de 1997 (*Figura 1.2*). Se basa en la valoración intraoperatoria de la extensión peritoneal y ovárica, las adherencias y el grado de obliteración del Douglas, asignando a cada tipo de lesión una puntuación típica (score), siendo la suma de las puntuaciones obtenidas en cada apartado la que clasificaba en uno de los 4 estadios posibles (*Figura 1.1*):

I: mínimo, puntuación entre 1-5

II: leve, entre 6-15

III: moderado, entre 16-40

IV: severo, > 40

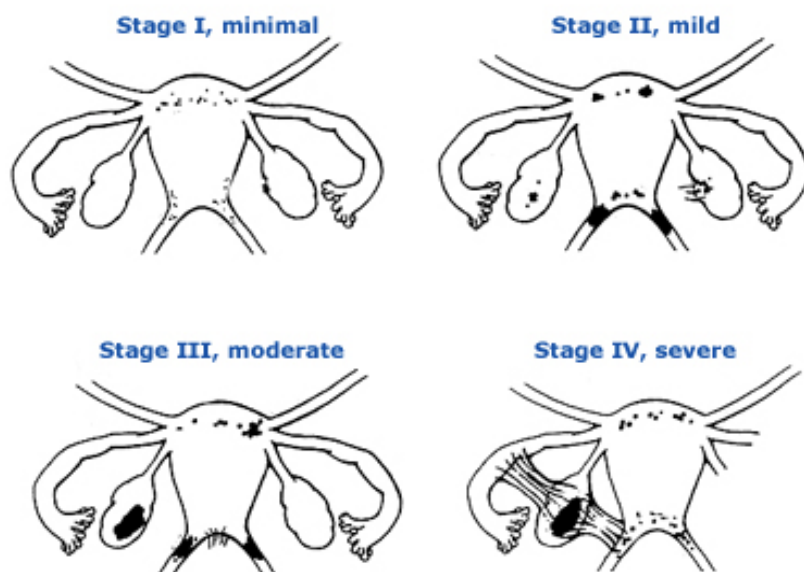


FIGURA 1.1 Estadios de endometriosis



SOCIEDAD AMERICANA SOCIETY PARA MEDICINA REPRODUCTIVA CLASIFICACION REVISADA DE ENDOMETRIOSIS

Nombre paciente _____ Fecha _____
 Grado I (Minimal) - 1-5 Laparoscopia _____ Laparotomia _____ Fotografia _____
 Grado II (Mild) - 6-15 Tratamiento recomendado _____
 Grado III (Moderate) - 16-40 Pronóstico _____
 Grado IV (Severe) - >40
 Total _____

PERTONEO	ENDOMETRIOSIS	< 1 cm	1-3 cm	>3 cm
	Superficial	1	2	4
OVARIO	Profundo	2	4	6
	D Superficial	1	2	4
	Profundo	4	16	20
	I Superficial	1	2	4
POSTERIOR SACO DE DOUGLAS OBLITERACION		< Parcial	Completo	
		4	40	
OVARIO	ADHESIONES	< 1/2 Cierre	1/2 - 3/4 Cierre	> 3/4 Cierre
	D Transparente	1	2	4
	Opaco	2	8	16
	I Transparente	1	2	4
	Opaco	4	8	16
TROMPA	D Transparente	1	2	4
	Opaco	4*	8*	16
	I Transparente	1	2	4
	Opaco	4*	8*	16

*Si las fimbrias de las trompas de falopio están completamente adheridas, se cambia el punto asignado a 16.
 Indicar la aparición de implantes superficiales tipo rojo [(R), rojo, rojo-rosa, tipo llama, gota vesicular, vesículas claras], blancos [(W), opacificaciones, defectos peritoneales, amarillo-marrón], o negros [(B) negros, depósitos de hemosiderinas, azul]. Indicar el porcentaje total descrito como R ___ % B ___ % and N ___ %. El total debe ser igual al 100%.

Endometriosis Adicional: _____

Patología asociada: _____

Para ser usado con Trompas
y Ovarios normales



Para ser usado con Trompas y/o
Ovarios Anormales



FIGURA 1.2 Clasificación de la American Society of Reproductive Medicine (ASRM) de 1997

Esta clasificación presenta ciertas limitaciones: es subjetiva, carente de correlación clínica y evolutiva y no se correlaciona con el pronóstico reproductivo de las pacientes. No incluye las lesiones microscópicas ni realiza una evaluación cuantitativa de la afectación de otras estructuras pélvicas o extrapelvicas (Koninckx y cols, 1992). Tampoco valora la adenomiosis. Por ello, han surgido otros intentos de clasificación (Chapron y cols, 2003; Haas 2011; Adamson, 2010) pero que no han conseguido desbancarla, siendo actualmente la más adecuada para estandarizar y concretar criterios en el tratamiento y pronóstico evolutivo de la enfermedad.

1.1.6 Diagnóstico

.....

a) criterios clínicos

El síntoma más característico de la enfermedad es el **dolor pélvico crónico**, en forma de dismenorrea (50-90%), dolor intermenstrual (57-68%) y/o disparenia (25-40%) (Speroff y Fritz, 2006). También puede aparecer como una **hemorragia uterina disfuncional** tipo spotting, aunque se han descrito todos los patrones menstruales, generalmente debida a una disfunción ovulatoria asociada a la enfermedad.

La endometriosis y la **esterilidad** están muy relacionadas: existe una prevalencia en pacientes con esterilidad primaria del 26-45% y secundaria entre un 12-25% , frente a un 3-10% de la población general. La enfermedad severa compromete a ovarios y produce adherencias que ocluyen o dificultan la movilidad de las trompas. Algunos estudios han demostrado también una disminución de la reserva ovárica independiente de la edad en estas mujeres (Hock y cols, 2001). Se ha observado una calidad disminuida de los embriones obtenidos por fecundación in vitro (Pellicer y cols, 1995), responsable de la baja tasa de implantación asociada (Pellicer y cols, 1994). Esto podría deberse a alteraciones en la foliculogénesis y del medio ambiente paracrina y autocrina intrafolicular que padecen estas pacientes (Pellicer y cols, 1998; Garrido y cols, 2000). En endometriosis mínima o leve aún no está clara su relación con la esterilidad, aunque podría deberse a una alteración de los marcadores de la implantación endometrial (Matsuzaki y cols, 2004), o un ambiente peritoneal hostil que produjera daños en ADN espermático (Mansour y cols, 2009) o en el ovocito (Mansour y cols, 2010).

La endometriosis extrapélvica puede cursar con una amplia variedad de **síntomas cíclicos dependientes de la localización de los implantes**:

- urinarios: disuria, hematuria u obstrucción ureteral (Donnez y cols, 2000)

- intestinales: colon irritable, tenesmo perimenstrual, disquecia, hematoquecia, síntomas obstructivos o apendicitis (Yantiss y cols, 2001)
- pleurales y pulmonares: es rara y puede manifestarse como dolor torácico pleural o hemoptisis durante la menstruación o derrame pleural o neumotorax postmenstruales (Rychlik y Beber, 2001)
- pared abdominal: nódulos dolorosos en canal inguinal o subumbilicales o sobre cicatrices de cesáreas y episitomías (Brenner y Wohlgemuth, 1990)

b) exploración física:

La exploración de los genitales externos puede ser completamente normal. Sin embargo, es altamente sugestivo de esta enfermedad la presencia de dolor o dificultad a la movilización cervical y/o de ovarios, y una sensibilidad aumentada o la palpación de nódulos sobre ligamentos uterosacros acompañado o no de masas anexiales (EsKenazi y cols, 2001).

c) técnicas diagnósticas no invasivas:

La **ecografía** es la prueba de elección ante sospecha de endometriosis: es muy sensible en la detección de endometriomas y tiene una capacidad diagnostica similar a la resonancia magnética en los casos de endometriosis profunda (Somigliana y cols, 2010); sin embargo resulta ineficaz si las lesiones presentes tienen un tamaño menor de 5-10 mm (Bazot y cols, 2003).

Para valorar la presencia de nódulos en el tabique recto-vaginal o área de uterosacros es más utilizada la vía transrectal; la **ultrasonografía endoscópica anal** estaría recomendada para determinar con exactitud la profundidad de estas lesiones.

La **resonancia magnética** podría completar a la ecografía para el diagnóstico de endometriosis profunda que afecte a ligamentos uterosacros, vejiga y saco de Douglas pero carece de sensibilidad para lesiones rectales sin distensión del mismo (Kinkel y cols, 1999).

d) técnicas invasivas: Cirugía laparoscópica

Es el “**gold standar**” en el diagnóstico de la endometriosis (ESHRE 2005), ya que nos permite la visualización global de toda la pelvis y realizar un correcto estadiaje de la enfermedad, así como la toma de biopsias para su confirmación histológica.

e) biomarcadores:

Las nuevas tecnologías de cribado molecular, como la genómica, proteómica, citogenética y microarrays de genes/proteínas está siendo ampliamente utilizadas para la identificación de marcadores biológicos que permitan el desarrollo de pruebas no invasivas de diagnóstico precoz tales como:

- Marcadores tumorales y polipéptidos: CA-125, CA 19.9, sICAM-1 y Proteína Placentaria-14 en suero.
- Marcadores inmunológicos: Citoquinas (IL-6) y anticuerpos antiendometriales y marcadores de estrés oxidativo en suero.

- Marcadores en tejido endometrial: Aromatasa P 450, receptores hormonales e inmunohistoquímica de fibras nerviosas.

Aunque la detección de estos marcadores por separado no parece estar resultando útil actualmente para el diagnóstico precoz, últimas tendencias (May y cols, 2011) apuntan a que una combinación de varios de ellos podría ayudar a obtener mejores resultados en este aspecto (Elgafor y cols, 2013).

1.1.7 Tratamiento

Debe ser individualizado en función de la edad, extensión de la enfermedad, duración de la infertilidad, deseo reproductivo de la pareja y severidad de síntomas. Así, en aquellos casos de reciente diagnóstico que presente estadios precoces y estén asintomáticas o en mujeres perimenopáusicas con sintomatología bien tolerada, que deseen evitar los efectos secundarios y el coste del tratamiento, una opción sería el **manejo expectante**. En función del tipo de acercamiento los tratamientos pueden clasificarse en quirúrgicos o farmacológicos tal y como se detalla a continuación.

1.1.7.1 Tratamiento quirúrgico:

Permite el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad y estaría indicado en:

- Fallo del tratamiento médico en el control de los síntomas
- Mujeres que rechazan o tienen contraindicaciones a la terapia médica

- Necesidad de un diagnóstico definitivo: En aquellas mujeres con sintomatología moderada sugestiva de endometriosis en las que ha fallado el tratamiento empírico con terapias de primera línea (AINES,ACOs).
- Para excluir malignidad en una masa anexial: la endometriosis puede formar quistes de inclusión peritoneales por adherencias pélvicas; estos quistes podrían presentar signos sugestivos de malignidad que precisarían confirmación quirúrgica.
- Tratamiento de la infertilidad: la cirugía es el tratamiento de elección en mujeres que esperan restablecer o preservar la fertilidad y padecen endometriosis moderada o grave (Speroff y Fritz, 2006)
- Obstrucción del tracto urinario o intestinal

La cirugía puede ser de dos tipos:

- **cirugía conservadora:** intenta conservar la anatomía pélvica lo máximo posible extirpando focos endometriósicos, adherencias, fulgurando focos,... siendo **de elección el abordaje laparoscópico**.
- **cirugía definitiva: la histerectomía total con salpingo-ooforectomía bilateral** se realiza en estadios avanzados y sin deseos genésicos tras fracaso de los otros tratamientos incluyendo el abordaje conservador, pudiendo aliviar el dolor y disminuir la posibilidad de nueva cirugía (Namnoum y cols, 1995).

La cirugía laparoscópica es el gold standard para establecer el diagnóstico de endometriosis y proporciona una oportunidad para un tratamiento quirúrgico conservador en el mismo acto. Una intervención terapéutica sería deseable en el momento del diagnóstico

para ablacionar o extirpar implantes y adhesiones, lo que potencialmente prevendría o retrasaría la enfermedad o progresión de los síntomas. Una cirugía precoz también evitaría los costosos y amplios efectos secundarios de la terapia médica; sin embargo, aunque la cirugía es el único método totalmente eficaz para erradicar la endometriosis, la posibilidad de recidivas es elevada y no sería una solución aceptable el intervenir a una paciente reiteradamente. Además, las potenciales desventajas de la misma, que se multiplican con el número de cirugías realizadas sobre la misma paciente, como el daño inadvertido en órganos adyacentes (especialmente intestino y vejiga), las complicaciones infecciosas postquirúrgicas o el daño mecánico a las estructuras pélvicas que derivaría en una mayor formación de adhesiones desaconsejarían o limitarían su uso a situaciones muy determinadas como las descritas anteriormente. Así pues debemos procurar como alternativa a estas pacientes otros tratamientos no invasivos que permitan su uso a largo plazo, dada la naturaleza crónica de la endometriosis. Estamos en síntesis refiriéndonos a los tratamientos farmacológicos que se describen a continuación.

1.1.7.2 Tratamiento farmacológico:

El tratamiento farmacológico como su propio nombre indica persigue la eliminación o reducción de las lesiones y/o su sintomatología a partir de la administración de drogas comerciales y/o productos naturales. Se pueden distinguir básicamente tres

modalidades como son los antiinflamatorios no esteroideos, los tratamientos hormonales clásicos y las nuevas terapias.

1.1.7.2.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINES):

Son también conocidos como fármacos antiprostaglandínicos. Persiguen el alivio de cualquier tipo de dolor, de leve a moderado y suponen la *primera línea de tratamiento* por su accesibilidad, bajo coste, tolerabilidad de efectos secundarios y evidencia en ensayos clínicos de mejoría de la dismenorrea primaria. Las mujeres con endometriosis producen una mayor cantidad de prostaglandinas en la zona pélvica (Ylikorkala y cols, 1985). Estos fármacos actúan sobre las prostaglandinas, las cuales aumentan la intensidad de la contracción intestinal y uterina, causando dolor y calambres típicos de la dismenorrea y además ejercen un efecto antiinflamatorio, actuando sobre el tejido endometrial inflamado durante la menstruación disminuyendo el dolor (Moghissi,1999).

Sin embargo este tratamiento resulta insuficiente en endometriosis severas o de larga evolución y proporcionan sólo un tratamiento sintomático, sin influir en la progresión de la enfermedad con el tiempo. En aras de eliminar o al menos interferir en el desarrollo de las lesiones se aconseja el uso de estrategias que aborden el crecimiento hormonodependiente de la enfermedad mediante la terapias hormonales clásicas tal y como se refleja a continuación.

1.1.7.2.2 Terapias hormonales clásicas:

Están basadas fundamentalmente en la supresión estrógenica, debido al carácter hormono-dependiente de esta enfermedad (Burney y Giudice, 2012). Esto conlleva una serie de efectos secundarios derivados de la acción hormonal, como la inducción de una menopausia artificial en muchos casos o la interferencia con la función reproductiva (Prentice A y cols, 2000).

En general todos los tratamientos hormonales disponibles actualmente son equiparables en términos de eficacia. La mayor limitación de los tratamientos farmacológicos hormonales es que si bien detienen la progresión de la enfermedad no reducen ni eliminan las lesiones ya formadas, que requerirían de cirugía. El alivio del dolor, las tasas de embarazo y de recidiva son similares en todas las formas de tratamiento médico, por lo que la elección será individualiza y según criterios de coste-beneficio y efectos secundarios (Speroff y Fritz, 2006).

El objetivo de estos tratamientos es *disminuir la producción de estrógenos* por el ovario, dando lugar a una decidualización y posterior atrofia del tejido endometrial eutópico y ectópico (Sanchez-Fernandez, 2011). Se distinguen principalmente:

- Anticonceptivos orales combinados (ACO):

Utilizados en el *manejo inicial* de la endometriosis para el dolor mínimo a moderado, en mujeres con deseo anticonceptivo (Harada y cols, 2008), siendo una de sus principales ventajas frente a otros tratamientos hormonales el poderlos tomar de manera más prolongada

e incluso en ocasiones indefinida. Inhiben la ovulación e inducen una pseudodecidualización y atrofia del tejido endometrial. Son de gran interés tras un tratamiento quirúrgico pues recientes estudios han demostrado una reducción del 47% de la tasa de recurrencia de endometriosis tras cirugía frente a placebo, proporcional al tiempo de utilización de los ACO (Vercellini y cols, 2008). Sin embargo, los ACO pueden producir sangrados uterinos disfuncionales, cefaleas, náuseas, vómitos, aumento de peso, de la tensión mamaria, depresión y disminución de la libido, al igual que los progestágenos a altas dosis (Surrey, 2006).

- Análogos de la GnRH:

Actúan de manera continua sobre los receptores hipofisarios de GnRH disminuyendo la actividad gonadotrófica (down-regulation) e induciendo una supresión reversible de la esteroidogénesis ovárica. Este estado de hipogonadismo hipogonadotropo va a producir una reducción de las lesiones endometriósicas controlando el dolor y facilitando una posterior cirugía (Prentice A y cols, 2000). Algunos de los más empleados son: leuprolerina, buserelina, nafarelina, histrelina, goserelina y triptorelina; se emplean vía intramuscular, subcutánea o nasal con una duración aproximada de entre 3-6 meses, pues más allá de este tiempo aumentan el riesgo de osteoporosis. Sus efectos secundarios son los derivados de una menopausia artificial como sofocos, insomnio, atrofia y sequedad vaginal, depresión, irritabilidad,... y suelen reducirse si se añaden progestágenos a altas

dosis o en combinación con dosis bajas de estrógenos (terapia “add-back”) (López y cols, 2009), sin detrimento del efecto terapéutico.

- Gestágenos:

Inhiben el crecimiento del tejido endometrial causando una decidualización inicial, seguida de atrofia. También inhiben la secreción hipofisaria de gonadotropinas y la producción hormonal ovárica, causando anovulación e incluso amenorrea (Speroff L y Darney, 2005; Milsom I y Korver T, 2008).

En general, son una buena alternativa como mantenimiento o en caso de que otros tratamientos no fueran posibles. Sin embargo, no estarían indicados en mujeres que deseen gestación a corto plazo pues la ovulación tarda unos meses en recuperarse tras su suspensión. Además producen una serie de efectos secundarios (dependientes de la dosis, duración y vía de administración) en ocasiones mal tolerados por las mujeres, como alteraciones menstruales (tipo sangrado uterino irregular o spotting hasta en un 40-70%), náuseas, vómitos, aumento de peso, tensión mamaria, retención de líquidos, depresión y disminución de la libido (Surrey, 2006), que los hacen situarse en segunda línea de tratamiento.

- Danazol:

Es un agente androgénico derivado de la 19 nortestosterona que a dosis elevadas produce una inhibición hipofisaria de las gonadotrofinas y de la producción hormonal ovárica, suprimiendo la ovulación, menstruación y provocando la atrofia del endometrio.

También aumenta las concentraciones de testosterona libre, creando un ambiente rico en andrógenos y pobre en estrógenos que inhibe el crecimiento de la endometriosis. Sin embargo, hasta un 85% de las pacientes presentan efectos secundarios derivados de su acción masculinizante, que en algunos casos obligan a suspenderlo. (Barbieri y cols, 1982 y 1987).

- Gestrinona:

Es un derivado 19-noresteroideo con acción antiestrogénica que induce una reducción de receptores de estrógenos y progesterona en el endometrio aumentando la testosterona libre con la consecuente atrofia del endometrio y las lesiones endometriósicas. Mejora la dispareunia, dismenorrea y dolor pélvico debidos a endometriosis al igual que el danazol. Entre sus efectos secundarios destacan la atrofia mamaria, alteraciones menstruales, alopecia y cloasma “pseudogravídico”; además esta contraindicado durante el embarazo por su embriotoxicidad (Crosignani y cols, 2006; Fedele y Berlanda, 2004)

Dado que ninguno de los tratamientos anteriores elimina completamente los síntomas de la enfermedad y que todos van a presentar limitaciones importantes en su uso derivadas de la afectación del ambiente hormonal, se están buscando nuevas alternativas que ofrezcan tratamientos más efectivos y/o menor severidad en efectos secundarios presentados como las descritas a continuación.

1.1.7.3 Nuevas terapias en el tratamiento de la endometriosis

a) Tratamientos hormonales experimentales

a.1) Antagonistas de la GnRH

Producen una supresión rápida de la secreción de gonadotrofinas mediante competición selectiva con el receptor de la GnRH endógena, evitando el efecto *flare up* de los agonistas. Sin embargo, en comparación con estos últimos presentan un coste más elevado y una posología más compleja, además de tener los mismos efectos secundarios tipo “menopausia-like” (Kupker y cols, 2002).

a.2) Inhibidores de la aromatasa

La aromatasa es la enzima que cataliza el paso de andrógenos a estrógenos (estrona y estradiol). Se ha demostrado un aumento de su expresión en los implantes endometriósicos y en el endometrio de pacientes con endometriosis. (Bulun, 1999).

Los inhibidores de la aromatasa van a disminuir la producción de estrógenos en el cerebro, ovario, lesiones endometriósicas y periferia (piel, tejido adiposo,..) (Sebastian y Bulun, 2001). El anastrozol y letrozol han sido utilizados con éxito en la endometriosis (Amsterdam y cols, 2005; Ailawadi y cols, 2004; Soysal y cols, 2004) pero los efectos secundarios sobre la desmineralización de la matriz ósea contraindican su uso prolongado (Buzdar, 2004).

a.3) Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMS)

Son un ligando sintético del receptor de estrógenos; van a modular dicho receptor pudiendo tener efectos antiestrogénicos o proestrogénicos en función del tejido diana (Speroff y Fritz, 2006). En este sentido por ejemplo, el raloxifeno presenta una acción antagonista en endometrio (atenuando su crecimiento) y agonista en el hueso (preservando la densidad mineral ósea); sin embargo su utilidad está reducida por sus efectos vasomotores. En animales ha demostrado una reducción del 70% del volumen de tejido ectópico, pero los resultados en humanos han sido contradictorios (Stratton y cols, 2008).

a.4) Moduladores selectivos de los receptores de progesterona (SRPMs)

Tienen efecto agonista/antagonista sobre los receptores de progesterona en función del tejido diana. Suprimen la producción de prostaglandinas a nivel endometrial y tienen efecto directo sobre la proliferación endometrial y la formación de vasos en el endometrio (Chwalisz y cols 2005), manteniendo los niveles de estrógenos circulantes, lo que mejora su tolerabilidad frente a agonistas. En contrapartida, la tendencia a aumentar el riesgo de hiperplasia endometrial observada podría restringir su uso (Chwalisz y cols, 2004).

En general debe mencionarse que el uso de **tratamientos hormonales**, ya sean los clásicos o los experimentales, presenta importantes limitaciones a considerar: no pueden utilizarse en

pacientes con deseo genésico pues interfieren con la ovulación y la receptividad endometrial; su uso en el tiempo está limitado por los efectos secundarios de ellos derivados, y tampoco han demostrado eficacia completa en la supresión de los síntomas o en la eliminación de la progresión de la enfermedad (Mihalyi y cols, 2006).

Los múltiples avances en el conocimiento de la fisiología de la enfermedad realizados en los últimos años, junto a las carencias de los tratamientos actuales han volcado el interés en el estudio experimental con nuevos tratamientos experimentales no hormonales que ofrezcan nuevas opciones terapéuticas a estas pacientes.

b) Tratamientos experimentales no hormonales

El objetivo de estos tratamientos, en su mayoría, en fase experimental, sería el controlar los síntomas de la enfermedad sin interferir en el estado hormonal de las pacientes, evitando de este modo los efectos secundarios derivados de esta supresión hormonal, a la vez que se les puedan ofrecer opciones reproductivas (Olivares y cols, 2008).

b.1) Fármacos hipolipemiantes

Se ha observado en estudios experimentales con *estatinas* en animales una disminución del crecimiento endotelial en los implantes mediante supresión de los genes que codifican proteínas implicadas en la inflamación y angiogénesis y reducción de la HMG-CoA reductasa (Bruner-Tran y cols, 2009; Cakmak y cols, 2012).

Otros estudios en ratas suplementadas con *ácido eicosapentaenoico (EPA)* han evidenciado una reducción del grosor del tejido endometriósico intersticial relacionado con la progresión de la endometriosis, así como una disminución de la proliferación de fibroblastos y MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos) y una supresión de algunos genes implicados en la patogenia de la enfermedad (IL-Beta, MMP13, MMP10 y MMP8) (Netsu S y cols, 2008).

El problema que presentan estos medicamentos es que son teratógenos recomendándose medidas anticonceptivas en las usuarias hasta mes y medio tras finalizado el tratamiento (Lecarpentier y cols, 2012). Además entre sus efectos secundarios más graves se han descrito casos de miositis y rabdomiolisis, por lo que se recomienda monitorizar pruebas de función hepática (pueden elevar las transaminasas transitoriamente) y muscular periódicamente durante el tratamiento (Kashani A y cols, 2006; Armitage J, 2007) . Esto obliga a contrastar la existencia de un beneficio claro de estos fármacos sobre la enfermedad pues su uso no está exento de complicaciones.

b.2) Bifosfonatos

Los macrófagos activados parecen promover el desarrollo de la endometriosis al perpetuar la disfunción inmunológica en la misma. Una posible línea terapéutica consistiría en reducir *in vivo* el número de macrófagos activados mediante partículas liposomales que al permitir la entrada de bifosfonatos fagocitarían e inactivarían a los

macrófagos circulantes, sin resultar tóxicos para células no fagocitarias (Dananberg y cols, 2002; Epstein y cols, 2007).

La administración de 10mg/kg de *alendronato liposomal* en roedores ha demostrado una reducción del tamaño de los implantes peritoneales, así como una reducción del número de monocitos y de la respuesta inflamatoria (Haber y cols, 2009).

Entre los efectos adversos de los bifosfonatos más frecuentes se incluyen problemas gastrointestinales (dolor abdominal, disfagia, esofagitis, úlcera esofágica,...) (Graham DY y cols, 1997 y 2001), síndrome pseudogripal (Black DM y cols, 2007), síntomas musculoesqueléticos (dolor muscular, articular) (Wysowski DK y Chang JT, 2005), patología ocular (uveitis, epiescleritis,...) (Etminan M y cols 2012) y osteomandibular (osteonecrosis de la mandíbula) (Khosla S y cols 2007), además de estar también contraindicados en la gestación por su teratogenia (Levy S, 2009). Por todo ello habría que demostrar un claro beneficio en humanos para recomendarlo como tratamiento.

b.3) Fármacos inmunomoduladores

El uso de inmunomoduladores deriva de la consideración de la endometriosis como enfermedad inflamatoria.

La **pentoxifilina**, ha sido una de las moléculas más estudiada por diversos autores: ha demostrado inhibir la fagocitosis por macrófagos, aumentar la liberación de enzimas proteolíticas y reprimir la producción de TNF- alfa, además de inducir la regresión de lesiones endometriósicas sin inducir un estado de hipoestrogenismo en modelo

animal (Nothnick 2001, Olive y cols, 2004). Estos resultados parecen prometedores en el tratamiento de la fertilidad para mujeres con endometriosis en estadios precoces (Balash y cols, 1997; Creus y cols, 2008).

b.4) Bloqueantes del Factor Nuclear KappaB (FN-kB)

El FN-kB es un factor de transcripción que induce la expresión de una amplia variedad de genes que intervienen en la respuesta inflamatoria (McKay y cols, 1999); algunos estudios han demostrado un papel importante en el proceso inflamatorio de las células del estroma endometrial en endometriosis (Yamauchi y cols, 2004; Guo SW, 2007).

En estudios con células cancerosas se han probado inhibidores del FN-kB y inhibidores de los proteosomas para impedir la liberación de los precursores del FN-kB con éxito (Orlowski y cols, 2002).

La *pirrolidina ditiocarbamato (PDTC)*, un potente inhibidor del FN-kB y el *bortezomib*, un inhibidor reversible del proteosoma han demostrado reducir el tamaño de implantes y frenar la progresión de lesiones en ratas a las que se les había implantado tejido endometriósico (Celik y cols, 2008).

b.5) Terapias antiangiogénicas:

La neoangiogénesis es un pre-requisito fundamental en el mantenimiento y desarrollo de la endometriosis una vez que los nódulos del tejido endometrial han quedado implantados (Nap y cols,

2004). Además, se ha observado un aumento de factores pro-angiogénicos y una disminución de factores inhibidores de la angiogénesis en el líquido peritoneal de las mujeres afectas (Lasche y Menger, 2007).

Entre los factores implicados en la angiogénesis destaca el *Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)*, una glicoproteína esencial en este proceso (Gargett y cols, 2002). Es liberado por los macrófagos presentes en mayores cantidades en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis frente a sanas (McLaren y cols, 1996). Existe una correlación positiva entre severidad de la enfermedad y liberación de VEGF en el líquido peritoneal (Bourlev y cols, 2006), y su expresión está aumentada en las lesiones endometriósicas activas (Donnez y cols, 1998) y en la endometriosis profunda (Machado y cols, 2008).

La unión del VEGF a su receptor tipo 2 (VEGFR2) parece ser el proceso principal por el cual este factor regula el mecanismo de angiogénesis (Watkins y cols,1999;Verheul y cols, 2000).

Entre los fármacos estudiados tenemos varios inhibidores de la angiogénesis como el *Avastin* (inhibidor específico del VEGF-A), *TNP-A*, *Endostatina*, *Anginex*,...que han demostrado su eficacia en la disminución de estas lesiones (Nap y cols, 2004) en animales. Sin embargo su uso no es viable en humanos debido a la gravedad de los efectos secundarios (flebitis, anorexia, astenia) para estas pacientes (Via y cols, 2000).

Por ello se están estudiando otras sustancias previamente aprobadas para otras enfermedades, y que aún conservando su efecto

antiangiogénico presenten efectos secundarios asumibles, como las citadas a continuación:

b.5.1) inhibidores selectivos de la COX-2: celecoxib

La ciclooxigenasa (COX) tipo 1 y 2 son isoenzimas que catalizan la síntesis de prostaglandinas. La Cox-2 se encuentra aumentada en procesos dolorosos e inflamatorios.

Se ha observado una sobreexpresión de la COX-2 en el endometrio eutópico y ectópico de mujeres con endometriosis (Ota y cols, 2001; Matsukaki y cols 2004).

Estudios en modelo animal han demostrado que la administración de celecoxib bloquea el crecimiento celular e induce la apoptosis en células tumorales (Kundu y cols, 2002; Basu y cols, 2005), siendo además un potente inhibidor de la angiogenesis (Basu y cols, 2005). También se ha observado que previene la implantación del tejido ectópico, y el crecimiento de lesiones ya existentes (Matsuzaki y cols, 2004), induciendo la regresión de los explantes endometriales en ratas (Dogan y cols, 2004) y ratones (Ozawa y cols, 2006).

En humanos, un estudio *in vitro* ha demostrado la reducción de la proliferación celular y la inducción de apoptosis de células epiteliales de endometrio junto con una disminución del VEGF en el fluido peritoneal de mujeres tratadas (sanas y endometriósicas) (Olivares y cols, 2008).

b.5.2) Té verde

La epigallocatequina galato (EGCG), un flavonoide del tipo galato que constituye uno de los principios activos del té verde, presenta una potente actividad antioxidante, anticancerígena y de inhibición del crecimiento del endotelio vascular *in vivo* e *in vitro* (Tang y cols, 2001).

Parece tener un potente efecto-antiangiogénico en diversos tumores (Fassina y cols , 2004), asociado a una inhibición del VEGF y su receptor (Basini y cols, 2005).

En modelos de endometriosis experimental en ratones, la EGCG ha demostrado una inhibición de la angiogénesis, la adhesión y la invasión de lesiones endometriósicas así como una reducción en el tamaño de las mismas (Rogers y cols, 2009) .

b.5.3) agonistas dopaminérgicos (quinagolida)

Los agonistas dopaminérgicos ejercen un efecto antiangiogénico al interferir la vía del VEGF/VEGFR2, concretamente a través de su receptor tipo 2, DrD2 (Basu y cols, 2001). Tras demostrarse que agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina y cabergolina eran capaces de revertir el proceso del incremento de la permeabilidad mediado por la sobreexpresión de VEGF/VEGFR2 en el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) (Gomez y cols, 2006), Novella-Maestre y cols decidieron experimentar estos fármacos en un modelo animal heterólogo de endometriosis tras probar la existencia de receptores de dopamina tipo 2 en tejido endometrial humano, tanto eutópico como endometriósico (Novella-Maestre y cols, 2010). En

este trabajo se demostró que el uso de Cabergolina (Cb2), un agonista dopaminérgico, producía una disminución del tamaño de las lesiones activas muy discreto y una disminución significativa del índice proliferativo (Novella-Maestre y cols, 2009). Se comprobó que el uso de Cb2 se asociaba a una disminución en la expresión de factores proangiogénicos como VEGF y un aumento de la expresión de marcadores anti-angiogénicos como angiotensina 1. Finalmente se confirmó que el nivel de fosforilación del VEGFR-2 fue significativamente menor en los ratones tratados, de acuerdo a los hallazgos encontrados en el modelo de SHO anteriormente (Gómez y cols, 2006).

En otro estudio posterior el grupo de Delgado-Rosas (Delgado-Rosas y cols, 2011) empleando el mismo modelo animal que Novella y cols, demostró que otro agonista dopaminérgico D2 distinto de la cabergolina como la quinagolida era igualmente eficaz en la disminución de lesiones endometriósicas confirmando la hipótesis de Novella y cols.

Tomando como punto de partida estos experimentos, el grupo del Dr Pellicer (Gomez y cols, 2011) realizó un estudio piloto en humanos, para contrastar el efecto de los agonistas dopaminérgicos, en concreto la quinagolida, sobre las lesiones endometriósicas. Dado que a raíz de los resultados obtenidos de este estudio se generó la hipótesis de trabajo que motivó la realización de esta tesis doctoral creemos conveniente realizar una explicación detallada del diseño y resultados obtenidos en el mencionado trabajo de Gomez y cols.

Para llevar a cabo su estudio, Gomez y cols seleccionaron a un grupo de pacientes con hiperprolactinemia y endometriosis confirmada vía laparoscópica. Durante la laparoscopia inicial se extirparon todas las lesiones a excepción de unas lesiones rojas que se dejaron marcadas con hilo de sutura. Tras el fin de la cirugía se les suministró a las pacientes la quinagolida, como tratamiento de su patología basal. Tras cuatro meses de tratamiento se realizó una segunda laparoscopia exploradora con el objetivo de prevenir adhesiones y que se aprovechó para extraer las lesiones que habían sido marcadas 4 meses antes. Puesto que se grabaron ambas cirugías se pudieron determinar mediante análisis de imagen el tamaño de las lesiones antes y después del tratamiento obteniéndose resultados muy interesantes. A nivel macroscópico se evidencia una importante disminución del tamaño de las lesiones endometriósicas asociada a un incremento en la expresión del DrD2 (receptor de la dopamina tipo 2) en las mismas y una disminución de la expresión del VEGFR2 estadísticamente significativo. Si bien en el estudio previo en ratones no se observaron las disminuciones en el tamaño de las lesiones que sí se observaron en humanos, también sería justo mencionar que no se reprodujeron en humanos los esperanzadores resultados histológicos en aras del tratamiento de la enfermedad que sí se encontraron en los modelos animales de endometriosis (Novella-Maestre y cols, 2009; Delgado-Rosas, Gómez y cols, 2011). En este sentido no se pudo demostrar en humanos diferencias significativas en cuanto a la vascularización y neoformación de vasos. Si bien es cierto que los efectos antiangiogénicos en humanos pudieron quedar enmascarados

por la desaparición del tejido donde estos pudieran haberse producido, también es posible que otros efectos hasta la fecha desconocidos de la quinagolida pudieran ser responsables de dicha disminución de tamaño en humanos. Asumiendo que los efectos antiangiogénicos de la quinagolida en humanos pudieran ser modestos, comparados con el modelo animal, una posible discordancia entre los hallazgos en humanos y ratones, podría venir dada por el hecho de que los modelos animales donde se ensayó la quinagolida carecen de sistema inmune competente. Cabría pues plantearse que los efectos mencionados de la quinagolida hubieran venido mediados por éste y fueran responsables de la destrucción del tejido patológico.

A tenor de los resultados cabe plantearse que quizás hubiera sido más beneficioso evaluar el papel de los agonistas dopaminérgicos previamente en un modelo animal con un sistema inmune íntegro para poder trasladar con mayor fiabilidad el potencial papel de estos compuestos. Así pues parece lógico pensar ahora que cualquier compuesto que se pretenda ensayar en la endometriosis debería ensayarse al menos sobre un modelo con sistema inmune preservado si se desconoce el efecto sobre éste. Como veremos posteriormente, esta ha sido una de las motivaciones que nos ha impulsado a realizar la presente tesis doctoral sobre modelos animales inmunocompetentes. Antes de profundizar en este aspecto y volviendo al tema que nos ocupa en este apartado, en cuanto a los posibles mecanismos moleculares que explicarían la sorprendente capacidad de los agonistas dopaminérgicos para reducir el tamaño de las lesiones se plantearon en el estudio de Gomez y cols varias hipótesis

complementarias. Principalmente se plantearon que entre los muchos tipos de células inmunitarias que expresan DRD2, los macrófagos podrían ser los que desempeñaran un papel predominante (McKenna y cols,2002), en la reducción de las lesiones a través de una serie de mecanismos vertebradores y que se desglosan a continuación :

- A) Efecto deprivatorio sobre VEGF: el efecto antiangiogénico aunque modesto podría ser una de los responsables del fenómeno observado. En este sentido se ha visto que los macrófagos expresan VEGF en grandes cantidades (Nap y cols, 2004), de forma que la activación el DrD2 en los macrófagos por parte de la quinagolida, disminuiría la producción del VEGF y la angiogénesis mediada por el sistema VEGF-VEGFR2, ejerciendo de esta forma una acción inhibidora de la angiogénesis (Chakroborty y cols, 2008) y afectando de esta manera al tamaño de las lesiones endometriósicas.
- B) inducción de un perfil anti-inflamatorio y antiangiogénico: la endometriosis es una enfermedad en la que existe un ambiente proinflamatorio marcado, sobretodo a nivel del líquido peritoneal, en el que existe un aumento en la actividad y número de macrófagos y como consecuencia un aumento de citoquinas, las cuales participan activamente en la génesis y progresión de esta enfermedad (Tasuku, 2001). Neutrófilos y macrófagos promueven la angiogénesis en etapas iniciales de endometriosis, y las quimoquinas y citoquinas liberados por éstos (MIP-1 α , MIP-2, IL-6, TNF α , VEGF) amplifican el estímulo angiogénico para el crecimiento del tejido endometriósico (Lin YJ y cols, 2006). El perfil génico encontrado en las lesiones tratadas con la

quinagolida en el estudio de Gomez y cols parece ser coherente con la inhibición del perfil angiogénico-inflamatorio como responsable de las acciones inhibitorias de esta droga sobre el tejido patológico. En este sentido los PCR arrays evidenciaron que como resultado de la quinagolida se redujo la expresión génica de factores implicados en la angiogénesis y en los procesos inflamatorios tales como :

- *CXCL10 (C-X-X motif chemoquine 10)*, es uno de los reguladores antiangiogénicos más importantes (Yoshino y cols, 2003), y se mostró sobreexpresado tras el tratamiento con la quinagolida sugiriendo un efecto global de inhibición de la angiogénesis. Este gen codifica para la proteína CXCL10, también conocida como *Interferon gamma-induced protein 10* (IP10). Se le han atribuido varias funciones, como la quimiotaxis de monocitos/macrófagos, células T, células *Natural Killer*, y células dendríticas; promueven la adhesión de células T a las células endoteliales; presentan actividad antitumoral; y es un potente inhibidor de la angiogénesis (Dufour y cols, 2002).

La expresión de los siguientes genes se encontró a su vez inhibida por la quinagolida:

- *CCL2 (Quimioquina ligando 2)*: Este gen codifica para la quimioquina ligando 2 (CCL2), también conocida como proteína quimiotáctica de monocitos-1. Esta proteína recluta monocitos, células T de memoria y células dendríticas a los sitios de daño tisular, infección e inflamación. Es, por tanto, un mediador de la inflamación, y también de la neovascularización (Ulukus y cols, 2009).

- *VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular)*: Este gen codifica para el VEGF, el cual estimula la vasculogénesis y la remodelación angiogénica favoreciendo la formación de brotes angiogénicos y la supervivencia de las células endoteliales evitando la apoptosis celular y la regresión de los vasos (Oral y cols, 1996). También aumenta de forma considerable la permeabilidad vascular (Dvorak y cols, 1995; Clauss y cols, 1990), la cual es una vía indirecta de estimulación de la angiogénesis que precede o se produce de forma simultánea a su acción sobre las células endoteliales y ha demostrado ser un paso clave en el proceso de angiogénesis.
- *AGGF1:(Angiogenic factor with G patch and FHA domains)*: Este gen codifica para la proteína del mismo nombre, AGGF1. Se trata de un factor angiogénico que promueve la proliferación de células endoteliales (Tian y cols, 2004).
- *RUNX1 (Runt-related transcription factor 1)*: Este gen codifica para a proteína RUNX1, un factor de transcripción que regula la diferenciación de las células madre hematopoyéticas en células sanguíneas maduras (Konno y cols, 2007).
- *Serpina 1*: el gen que codifica para la proteína PAI-1 o inhibidor del activador del plasminógeno 1. Es el principal inhibidor del activador del plasminógeno tisular (tPA) la uroquinasa y los activadores del plasminógeno, y por tanto, de la fibrinólisis (Konno y cols, 2007).

El hecho de que los agentes pro-inflamatorios y angiogénicos VEGF, AGGF1, RUNX1 y CCL2 se encuentran significativamente expresados a la baja, mientras que el inhibidor de la inflamación CXCL10 esté sobreexpresado al alza tras quinagolida indicaría que

potencialmente este fármaco estaría revirtiendo el ambiente proangiogénico existente en las lesiones endometriósicas. Al convertir éste en un ambiente antiinflamatorio y antiangiogénico estaría actuando sobre diferentes niveles del proceso inflamatorio, previniendo el desarrollo y crecimiento de éstas. Así mismo el hallazgo de que la serpina 1, que es el gen implicado en la síntesis del PAI (Inhibidor del activador del plasminógeno) se encontrará infraexpresado en las tratadas con D2-ag (agonistas dopaminérgicos tipo 2) sugirió una tercera vía de acción de los compuestos a ensayo, vía macrófagos que describimos a continuación:

- *C) aumento de la fibrinólisis:* Otro mecanismo mediante el cual los macrófagos podrían ejercer una acción sobre las lesiones endometriósicas es mediante la activación del proceso de fibrinólisis. En este sentido se ha visto que la activación del DRD2 sobre los macrófagos aumenta su capacidad fagocítica (Sookhai y cols, 1999). Teniendo en cuenta que, el análisis de PCR arrays realizado en el estudio mostró una **regulación a la baja del Inhibidor del Activador del Plasminógeno (PAI-1)**, uno de los más potentes inhibidores de la fibrinólisis, cabría hipotetizar , que la unión de la quinagolida al DrD2 en los macrófagos promovió a una activación de la actividad fibrinolítica que conllevaría la disrupción y degradación de las lesiones endometriósicas, favoreciendo la disminución del tamaño e incluso desaparición de éstas.

Bajo la hipótesis inicial de que al estar inhibido el PAI, aumentaría la fibrinólisis y esto llevaría a la destrucción del tejido

endometriósico ectópico, nos planteamos como objetivo principal en esta tesis evaluar qué repercusión tendría su inhibición selectiva sobre la enfermedad. Antes de meternos de lleno en esta tarea quisimos sin embargo evaluar los conocimientos existentes al respecto del funcionamiento del sistema fibrinolítico y su potencial papel en la endometriosis tal y como se detalla a continuación.

1.2.- El sistema fibrinolítico

1.2.1 Aspectos generales de la fibrinólisis

La fibrinólisis se asocia coloquialmente con el conjunto de mecanismos encargados de deshacer los coágulos de fibrina originados durante los fenómenos tromboembólicos en condiciones patológicas. Sin embargo, el sistema fibrinolítico está involucrado en una gran variedad de procesos de tipo fisiológico como la regulación de procesos reproductivos o la regeneración tisular, así como otros de tipo patológico como la invasión tumoral y la endometriosis (Parrilla JJ y cols, 1975 a y b; Tomás Martínez JF y cols, 1991; Ny T y cols, 1993; Pepper MS y cols, 1993; Castelló R y cols, 2002; Gilabert-Estellés J y cols, 2003).

La base del funcionamiento sistema fibrinolítico es la conversión del plasminógeno, en su enzima activa, la plasmina, capaz de degradar el coágulo de fibrina (Collen D y Lijnen HR, 1991; Lijnen HR y Collen D, 1993) (*Figura 1. 3*) y que se promueve mediante la acción

proteolítica de dos enzimas, el activador tisular del plasminógeno (tPA) y activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). A esta tendencia profibrinolítica se opone una actividad antifibrinolítica, mediada por la acción de los inhibidores naturales de los activadores del plasminógeno que son el inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 o 1 (PAI-1) y en menor medida el inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 2 o placentario (PAI-2). Existe un tercer inhibidor de los activadores del plasminógeno denominado inicialmente PAI-3 y que más tarde fue identificado como uno de los inhibidores de la proteína C activada (PCI) (Heeb MJ y cols, 1987; España F y cols, 1989b). Dicho inhibidor es capaz de inhibir a la uPA y al tPA de dos cadenas pero, aunque su concentración plasmática es superior a la de los otros PAIs, su actividad inhibitoria a nivel fibrinolítico es menor (Stump DC y cols, 1986 a y b; España F y cols, 1993a).

La actividad proteolítica de la plasmina está además regulada por la acción de la alfa2-antiplasmina, su principal inhibidor fisiológico y, en menor medida, por la alfa2-macroglobulina (Christiansen y cols, 2007). Una correcta hemostasia va a depender del correcto equilibrio entre todos estos factores. Además de su función fibrinolítica a nivel plasmático, la plasmina tiene una importante función proteolítica a nivel tisular. La plasmina interviene en procesos de proliferación y adhesión celular, posee actividad proteolítica sobre la matriz extracelular y regula la activación de factores de crecimiento y metaloproteasas. Parece implicada en procesos fisiológicos como la menstruación, la ovulación y la

implantación embrionaria (Sappino AP y cols, 1989; Liu YX, 1999) y en situaciones patológicas como la endometriosis (Bruse C y cols, 1998; Gilabert-Estellés J y cols, 2003) o el cáncer (Dano K y cols, 1985; Castelló R y cols, 2002).

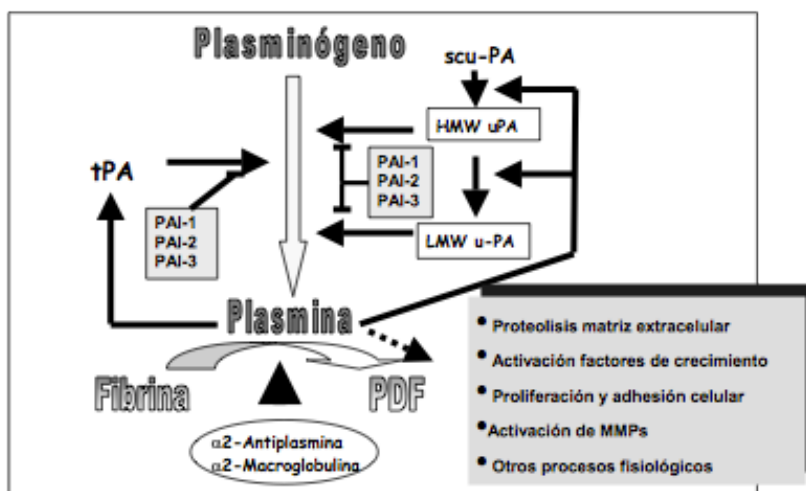


FIGURA 1.3 Esquema simplificado del funcionamiento del sistema fibrinolítico. *tPA: activador tisular del plasminógeno; uPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa; scu-PA: activador de uPA de una cadena; HMW uPA: activador de uPA de alto peso molecular; LMW uPA: activador de uPA de bajo peso molecular; PAI: inhibidor del activador del plasminógeno; PDF: productos de degradación de la fibrina.*

Una descripción más detallada de los principales componentes enzimáticos que intervienen en el proceso de la fibrinólisis se describe a continuación:

1. 2. 2 Plasminógeno y plasmina

El **plasminógeno** es una glicoproteína sintetizada fundamentalmente en el hígado, y en menor medida en eosinófilos y células renales. La **plasmina** es la forma enzimáticamente activa del plasminógeno, que tiene como sustrato más específico la fibrina y el fibrinógeno. La plasmina se une a la alfa2-antiplasmina por los lugares de unión a la lisina (*LBS*) y por el centro activo. Cuando la plasmina está unida a la fibrina no se inactiva y actúa como un eficaz fibrinolítico generando los productos de degradación del fibrinógeno y la fibrina (Adam y cols, 2009; Cesarman-Maus y Hajjar, 2005) El plasminógeno y la plasmina son capaces de interactuar con los receptores del plasminógeno que existen en la superficie de otras células, como la endotelial (Plow EF y cols, 1991) regulando los procesos proteolíticos relacionados con la migración celular (Rijken y Lijnen, 2009). Para ello regula los niveles de las metaloproteasas, ya que produce una activación de los zimógenos inactivos y además posee una acción proteolítica sobre los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (Mignati P y Rifkin DB, 1993) (*Figura 1.4*); también degrada directamente diversas glicoproteínas, contribuyendo al proceso de remodelado tisular y al acceso de las metaloproteasas al colágeno sobre el que ejercerán su acción (Vassalli JD y cols, 1991).

Además, junto al activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), la plasmina posee capacidad de activar y liberar factores de crecimiento unidos a la matriz extracelular o a la superficie celular.

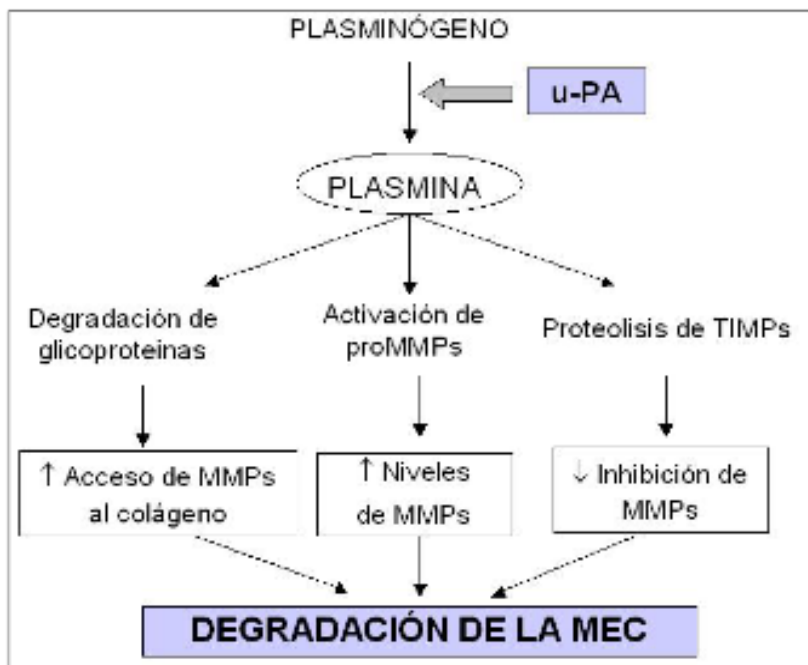


FIGURA 1. 4 Interrelación entre el sistema fibrinolítico y de las metaloproteasas (MMPs).

La plasmina ejerce su acción proteolítica sobre la matriz extracelular tras su activación por la uPA, de forma directa o indirectamente por aumentar los niveles de MMPs, facilitando así su acceso al colágeno de la MEC. uPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa; TIMPs: inhibidores tisulares de las MMPs; MEC: matriz extracelular (Mignati P y Rifkin DB, 1993).

1. 2. 3 Activadores fibrinolíticos

1. 2.3.1 Activador tisular del plasminógeno (tPA)

El tPA es una serín-proteasa sintetizada por las células endoteliales que se halla presente en el plasma. La mayoría se encuentra formando complejos con el PAI-1 , pudiendo detectarse alrededor de un 5% en forma libre en el plasma.

El tPA presenta una débil actividad enzimática en el plasma circulante, pero aumenta en gran medida en presencia de fibrina o de sus fragmentos (Bachmann F y Kruithof EK, 1984) debido a que esta promueve la interacción del tPA con su sustrato mediante el aumento de la concentración local de plasminógeno. La gran afinidad del tPA por el plasminógeno en presencia de fibrina da como resultado una eficiente activación del plasminógeno en la zona del coágulo.

La función de este potente activador del plasminógeno es determinante en el proceso de fibrinólisis a nivel endotelial, siendo su actividad proteolítica tisular de menor importancia que el activador del plasminógeno tipo uroquinasa.

1. 2. 3. 2 Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)

La uPA es una serín-proteasa de tipo tripsina, que se sintetiza inicialmente como una molécula de una sola cadena polipeptídica (scu-PA) (Holmes WE y col, 1985) y tras una digestión parcial por parte de la plasmina o la kalikreína, se convierte en una forma de

doble cadena (tcu-PA) denominada también uroquinasa de alto peso molecular (HMW-uPA). La scu-PA actúa directamente sobre el plasminógeno generando plasmina. A continuación, la plasmina convierte la scu-PA en tcu-PA, y ésta dirige finalmente la rápida activación del plasminógeno. En otros experimentos de activación del plasminógeno, en presencia de PAI-1, se puede concluir que la actividad de la scu-PA es tan sólo de un 0,1% en relación a la expresada por la tcu-PA (Orfeo T y cols, 1990). Por otro lado, la tcu-PA no tiene especificidad por la fibrina y activa el plasminógeno libre o unido a fibrina indiscriminadamente, a diferencia de la scu-PA que tiene una marcada especificidad por la fibrina.

Mientras que la activación del tPA es importante para el proceso de fibrinólisis, la uPA modula el proceso proteolítico pericelular de la matriz extracelular. A nivel celular, la uPA se une específicamente a su receptor (uPAR) expresado en diferentes tipos celulares (*Figura 1.5*) (Behrendt N y cols, 1990). Los complejos uPA:uPAR son susceptibles de inhibición por los PAIs, lo que podría jugar un papel importante en el control de la activación del plasminógeno a nivel tisular y la proteólisis de la matriz extracelular. Se ha publicado que la unión de la uPA a su receptor (uPAR), no sólo activa al plasminógeno, sino que también desencadena una cascada de señales celulares que regulan los procesos de migración celular en condiciones fisiológicas y patológicas, como es el caso de la angiogénesis, la implantación embrionaria, la reacción inflamatoria, la cicatrización cutánea y la implantación de metástasis tumorales (Carmeliet P y cols, 1994; Andreasen PA y cols, 1997; Mazar AP, 2001).

La vía de la uPA juega, en general, un papel importante en la fisiología uterina (Littlefield BA, 1991) y, más concretamente, en el inicio de la menstruación (Tabibzadeh S, 1996). La expresión de uPA está regulada por mecanismos paracrinos y factores esteroideos (Casslen B y col, 1992; Schatz y Lockwood, 1993). La uPA puede ser inactivada por progesterona en cultivos de células endometriales estromales debido a un aumento de la expresión de PAI-1 y de uPA-R en la superficie celular (Casslen B y col, 1995b).

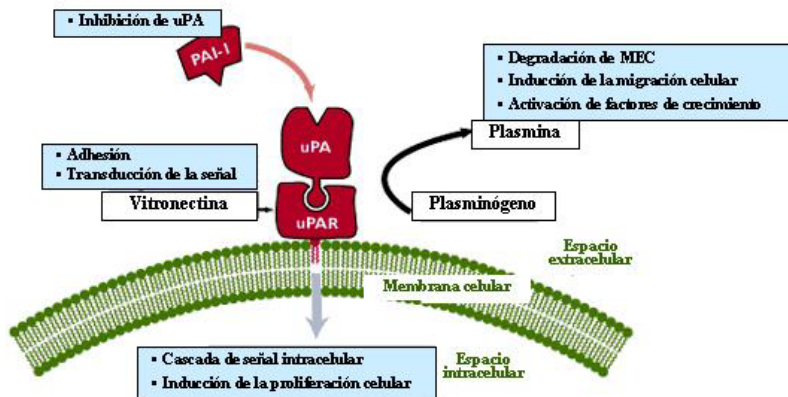


FIGURA 1.5 Modelo de unión de uPA a su receptor (uPAR). El receptor de uPA, uPAR, está anclado a la superficie de las células endometriales. La molécula de uPA es secretada y se une con gran afinidad y especificidad al uPAR. Esta unión activa la uPA limitando la actividad proteolítica en la superficie celular. Los componentes de la matriz extracelular son degradados por la plasmina, facilitando la migración celular y la angiogénesis. La vitronectina interacciona con

el uPAR desencadenando una activación de la cascada de señal intracelular (Wilex AG, 2003; Seiffert D y cols, 1991). MEC: matriz extracelular.

1.2.4 Inhibidores fibrinolíticos

Los inhibidores de los activadores del plasminógeno o PAIs son un grupo de proteínas con actividad inhibitoria sobre la activación del plasminógeno. Como hemos mencionado existen tres tipos de PAI, 1, 2 y 3 (Loskutoff DJ y col, 1983; Van Meijer M y Pannekoek H, 1995), (Bachmann F, 1995), y el PAI-3 Siendo el primero de ellos el más relevante en el control de la fibrinólisis.

1.2.4.1 Inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1)

Es una glicoproteína de cadena única sintetizada y secretada por una gran variedad de tipos celulares en cultivo (Loskutoff DJ y cols, 1988), incluyendo las células endoteliales (Loskutoff DJ y cols, 1983). Forma parte de la superfamilia de los inhibidores de las serín-proteasas o serpinas. La sangre contiene dos grandes reservorios de PAI-1 (Erickson LA y cols, 1984; Sprengers ED y cols, 1986). Las plaquetas constituyen la principal reserva de PAI-1, conteniendo de 4000 a 8000 moléculas por célula (100-200 ng/ml de sangre) (Kruithof EK y cols, 1986), mientras que una parte menor está presente en el plasma (alrededor de 10 ng/ml).

El PAI-1 se ha considerado como el principal regulador de la fibrinólisis *in vivo* (Loskutoff DJ y cols, 1988 y 1991). Se han observado con frecuencia niveles anormalmente elevados de PAI-1 en condiciones en las que el riesgo trombótico está aumentado, como la gestación (Kruithof EK y cols, 1987; Estellés A y cols, 1989a; Estellés A y cols, 1990; Estellés A y cols, 1994; Vicente V y cols, 1994) y en ciertas complicaciones obstétricas como la preeclampsia (Estellés A y cols, 1987, 1989a, 1991 y 1996; Gilabert J y cols, 1995a y b). También se detecta un aumento de sus niveles en el plasma de pacientes con trombosis venosa profunda (Juhan-Vague I y cols, 1987; Tabernero MD y cols, 1989) y en pacientes con infarto de miocardio (Estellés A y cols, 1985 y 1989b; Almer L y cols, 1987; Aznar J y cols, 1988 y 1994a).

La actividad fibrinolítica en el tejido endometrial humano es esencial en el proceso de regeneración tisular durante la menstruación (Parrilla JJ y cols, 1972). La actividad plasmínica, regulada por el nivel de inhibidores, determinará la proteólisis de las proteínas de la matriz extracelular, la activación de procólagenasas, y la degradación de diversos componentes de la membrana basal. La progesterona produce una disminución de la actividad fibrinolítica del endometrio mediante el estímulo de la degradación de uPA y el aumento de PAI-1 y uPAR (Casslen B y cols, 1995b).

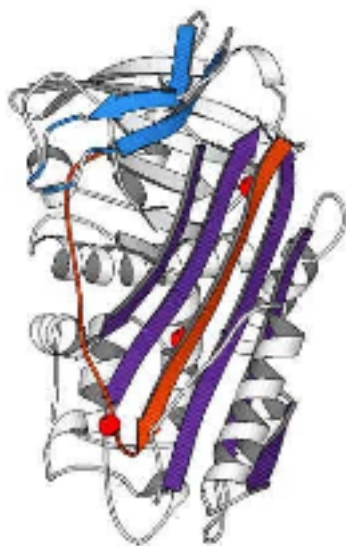


FIGURA 1.6 Modelo estructural de la conformación de la molécula del PAI-1 en estado latente.

Las flechas indican regiones de beta-hoja mientras que las espirales indican dominios de alfa-hélice (Tucker HM y cols, 1995).

El PAI-1 también está implicado en los procesos tumorales (Jankun J y cols, 1993; Harbeck N y cols, 2001; Palmieri D y cols, 2002). En este sentido, es importante resaltar el papel que actualmente se le concede a la uPA y a su receptor, uPAR, en los procesos de migración y degradación proteolítica de la matriz extracelular durante el desarrollo de las metástasis. A pesar de no conocerse en detalle el significado de este hecho, los niveles de PAI-1 y uPA son considerados importantes parámetros pronósticos y pueden tener una

creciente importancia terapéutica en algunos tipos de cáncer (Ruiz MA y cols, 1989; Janicke F y cols, 1993).

1. 2. 5 El sistema fibrinolítico en la endometriosis

A pesar de no disponerse de un conocimiento extenso en esta materia, vamos a tratar de mostrar los datos más relevantes que se han ido revelando durante los últimos años, en referencia a los procesos intercurrentes en el tejido ectópico de estas pacientes y a los acontecidos en el líquido peritoneal.

1. 2. 5.1 Tejido endometriósico

La disponibilidad de plasminógeno es esencial para que la plasmina ejerza su efecto de remodelado tisular y active las prometaloproteasas. Existen niveles elevados de plasminógeno en las células endometriales y en la matriz extracelular tanto del tejido uterino como del endometrio ectópico de las mujeres con endometriosis que sugiere un potencial elevado para la proteólisis extracelular. Por el contrario, la expresión de plasminógeno es débil en el estroma de los tejidos ovárico y peritoneal en los que se ha implantado endometrio ectópico (Finlay TH y cols, 1983).

Casslen y col (1995b) observaron un efecto negativo de la progesterona en la expresión de activadores del plasminógeno, debido al aumento de la expresión de PAI-1 y de uPAR en la superficie celular. La formación de complejos uPA:PAI-1 y su unión al receptor facilita el aclaramiento de plasmina activa.

La cuantificación proteica, mediante técnicas de ELISA, ha evidenciado una *mayor concentración de uPA y PAI-1 en endometrio de mujeres con endometriosis* que en el endometrio de controles. Estos niveles son todavía *mayores al estudiar muestras de tejido endometriósico* (Bruse C y cols, 1998). La mayor concentración de uPA en el endometrio de mujeres con endometriosis podría llevar a una anormal degradación del tejido endometrial durante la menstruación. De esta manera, se originarían fragmentos de tejido endometrial con un potencial mayor para degradar la matriz extracelular que en la mujer sana, lo que facilitaría su implantación (Wild RA y cols, 1994; Evers JL y cols, 1995). Sin embargo, los niveles de uPA en cultivos de células endometriales estromales son menores en el tejido eutópico y ectópico de mujeres con endometriosis y su expresión se mantiene estable en el tiempo (Guan YM y cols, 2002). Este escenario sugiere que inicialmente y en aras de promover la diseminación e implantación de las lesiones, éstas promoverían la fibrinólisis del tejido donde se van a implantar. Posteriormente y una vez implantado, la fibrinólisis estaría disminuida o inhibida en los tejidos endometriósicos un vez implantados para evitar su degradación.

1. 2. 5. 2 Líquido peritoneal

El hallazgo de niveles de tPA y uPA aumentados en el líquido peritoneal en mujeres con endometriosis o adherencias peritoneales establecidas podría sugerir una activación secundaria del sistema fibrinolítico para limitar la formación de nuevas adherencias

(Edelstam G y col, 1998). *La administración intraperitoneal de anticuerpos anti PAI-1 ha demostrado reducir la incidencia de adherencias tras una lesión quirúrgica del peritoneo*, probablemente por limitar la disponibilidad de PAI-1 para la inhibición del tPA (Falk K y cols, 2001).

Existen resultados conflictivos en la literatura en relación a la actividad fibrinolítica en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis (Duselman GA y cols, 1988). Algunos autores han descrito una actividad del activador del plasminógeno en el líquido peritoneal similar en pacientes con o sin endometriosis (Batzofin JH y cols, 1985). Sin embargo, Astedt y Nordenskjold (1984) encontraron un aumento en los niveles de activadores del plasminógeno en el líquido peritoneal de las mujeres con esta enfermedad.

Al estudiar los inhibidores fibrinolíticos en el líquido peritoneal se observan resultados diversos que varían en función de la técnica utilizada y el estadio de la enfermedad. Bruse y cols (1998) encontraron una *mayor concentración de PAI-2 en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis* al compararlas con los controles libres de enfermedad. Estos resultados podrían explicarse por la existencia de una mayor actividad de los macrófagos peritoneales en las mujeres con endometriosis que serían responsables del aumento de la secreción de PAI-2 al medio peritoneal. Por el contrario, cuando se estudian exclusivamente *los estadios iniciales* de la enfermedad, con presencia de implantes peritoneales pero *sin síndrome adherencial asociado*, se evidencia una *disminución de los niveles de PAI-2* en líquido peritoneal (Bruse C y cols, 1998). Además,

los niveles de PAI-2 antigénico aumentan tras la liberación quirúrgica de las adherencias (Edelstam G y cols, 1998). En síntesis, el aumento del nivel de uPA en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis sugiere que el sistema fibrinolítico se activa secundariamente para limitar la neoformación de adherencias.

Estos datos hacen hipotetizar un papel dual de la fibrinólisis durante el desarrollo de la endometriosis. Durante los estadios iniciales se favorecería la implantación promoviendo la fibrinólisis mientras que durante estadios más avanzados se favorecería la estabilidad y mantenimiento de los implantes mediante la inhibición de la misma.

Con todo ello parece que, por los estudios tanto en tejido endometriósico como a nivel peritoneal, el sistema fibrinolítico juega un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad, que vamos a tratar en el presente trabajo de determinar. En este sentido la activación de la fibrinólisis endógena surge como una vía terapéutica adecuada para la inhibición de los implantes; y esta fibrinólisis se podría promover más en concreto mediante la inhibición del PAI-1. Con este fin, sería coherente realizar estudios dirigidos a inhibir la función del mismo, para lo cual existen inhibidores comerciales en el mercado, que pasaremos a describir a continuación.

1.3 Inhibidores farmacológicos del PAI-1

Los avances en el desarrollo de pequeñas moléculas inhibidoras del PAI-1 ha surgido a consecuencia de las recientes investigaciones

en nuevas terapias antitrombóticas. Los efectos antitrombóticos de la inhibición del PAI se obtienen mediante la potenciación de la actividad fibrinolítica endógena sin afectar directamente a la coagulación sanguínea ni a la función plaquetar. El análisis fenotípico de la deficiencia del PAI tanto en humanos como en roedores sugiere que la inhibición del PAI no conduce a hemorragias severas o otros efectos adversos mayores. Así pues, los inhibidores del PAI representan una nueva clase de fármacos antitrombóticos con un índice terapéutico más amplio que los convencionales agentes antiplaquetarios o anticoagulantes. Además de en el campo de la trombosis, el PAI-1 también juega un papel importante en otros procesos patológicos como las enfermedades inflamatorias, la fibrosis pulmonar inducida por quimioterapia, la progresión del cáncer o la endometriosis, como pretendemos demostrar en este estudio. El desarrollo prometedor de los inhibidores del PAI en el terreno de la anticoagulación nos abriría puertas para su aplicación en otras áreas como las arriba mencionadas, entre ellas la de la endometriosis. (Qingyu Wu and Zuchun Zhao, 2002).

1.3.1 Inhibidores de uso clínico

Existen en el mercado diversos fármacos comercializados para otros fines diferentes de la terapia antitrombótica que entre sus mecanismos de acción se ha descubierto posteriormente que producen una disminución del PAI-1; así como ejemplo, tenemos los citados a continuación:

-*Fibratos (gemfibrozilo)*: estos agentes antihiperlipidémicos han demostrado una disminución de la producción del PAI-1 dosis dependiente en cultivos de células endoteliales (Fujii, S y cols, 1993 y 1995).

-*Raloxifeno y tamoxifeno*: son compuestos derivados de los estrógenos desarrollados para el tratamiento de la osteoporosis y el cáncer de mama respectivamente (Mitlak, B.H y cols 1999; Goldfrank, D. y cols 1999). Han demostrado inhibir la secreción de PAI-1 inducida por IL-1 en células endoteliales humanas. (Kilbourne y cols, 1999).

-*Medicina tradicional China*: El *Panax notoginseng* ha sido utilizado en la medicina China como tonificante de la circulación sanguínea. Zhang y cols examinaron los efectos del 20 ('S)-protopaxatrol notoginsenosido R1 (NR1), el mayor constituyente de esta hierba medicinal en la síntesis del t-PA y del PAI-1 en cultivos de células endoteliales y encontraron que el NR1 estimulaba la producción de t-PA de manera dosis dependiente (Zhang y cols 1994, 1997). Además inhibía la inducción del lipopolisacarido del PAI-1 y la síntesis del factor tisular en estas células. El *Astragalus Membranaceus* es otra hierba medicinal China usada para mejorar la circulación sanguínea. En cultivos celulares, el saponin astrogalósido IV (AS-IV), el mayor principio activo del Astragalus, ha demostrado aumentar la expresión de tPA y disminuir la de PAI-1 en cultivos de células endoteliales humanas (Zhang y cols 1997).

1.3.2 Inhibidores en desarrollo

A consecuencia del demostrado papel que juega la inhibición del PAI-1 en diversos trastornos trombóticos, se han ido desarrollando a lo largo de los últimos años diversos anticuerpos policlonales y monoclonales, oligonucleótidos e incluso, más recientemente, pequeñas moléculas dirigidos a la inhibición del mismo. Para ello se han ido realizando estudios preclínicos en modelos animales con el fin de obtener inhibidores del PAI cada vez más novedosos y con mejor biodisponibilidad y farmacocinética. A continuación citaremos algunos de los más relevantes:

a) *Anticuerpos monoclonales y péptidos*: como ejemplo tenemos MAb2 (Nielsen, L.S. y cols, 1986), MA-8H9D4, MA-33B8, MA-33H1F7, MA-35A5, MA-55F4C12, MA- 56A7C10 (Debrock, S. y Declerck, P. J, 1997) o el péptido 17-mer (Chavakis y cols, 2002)

b) *Pequeñas moléculas*: Las podríamos dividir en dos grupos:

=> Inhibidoras de la producción del PAI-1: Testadas en células endoteliales, como por ejemplo los fibratos (fármaco comercializado para tratamiento de la hiperlipemia) (Fujii, S y cols, 1993 y 1995), el 3,4,5-trimetoxibenzolideno o T686 (Vinogradsky, B y cols 1997) y otros derivados del butadieno como el T-2639 (Miyazaki H y cols, 2008 y 2010).

=> Inhibidoras de la actividad del PAI-1: Testadas en modelos preclínicos, se dispone de una amplia variedad:

- *derivados de las piperazinas*: XR334 (Bryans y cols, 1996), XR5118 (Einholm, A. P. y cols, 2003) XR11211 (Folkes, A. y cols, 2001), AR-H029953XX (Gils, A. y cols, 2002), S35225 (Rupin, A y cols, 2008) ó ZK 4044 (Liang, A y cols, 2005)

- *derivados de las oxodiazolidinodionas y del ácido indol-2-carboxílico*: como el WAY 14312 (Crandall, D. L y cols, 2003) Aleplasinin ó PAZ 417 (Jacobsen, J. S. y cols, 2008) y el Triplaxtinin ó PAI 039 (Elokda, H. y cols, 2004). De entre todos ellos profundizaremos en este último por ser de largo el más potente y mejor estudiado.

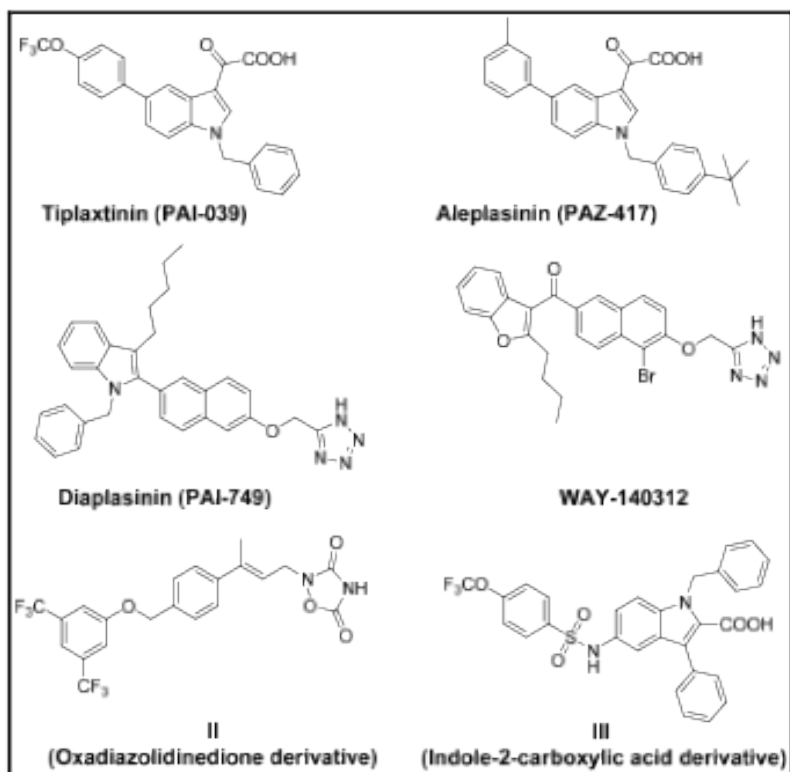


FIGURA 1.7 *Inhibidores del PAI-1 derivados de las oxodiazolidinodionas y del ácido indol-2-carboxílico*

El **Triplaxtinin o PAI-039** ha sido identificado como un potente y selectivo inhibidor del PAI-1 usado en variedad de ensayos in vitro y con eficacia demostrada in vivo en múltiples modelos de trombosis arterial aguda. Recientemente ha sido probado para investigar el papel del PAI-1 en el remodelado tisular en un modelo de ratón al cual se le ha activado el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SAA): La angiotensina II promueve la fibrinólisis cardíaca y el remodelado vascular a través de la activación del PAI (Vaughan DE y cols, 1995;

Oikawa T y cols, 1997; Chen HC y cols, 2000). El tratamiento con PAI-039 aislada reduce la actividad plasmática del PAI-1 y disminuye los niveles plasmáticos de glucemia sin afectar al sistema renina-angiotensina-aldosterona (SAA). El tratamiento tras la activación del SAA mediante la infusión en el ratón de Angiotensina II con PAI-039 proporciona protección contra la angiotensina II, evitando la inducción del remodelado aórtico (a través de mecanismos que implican alteraciones en la expresión de genes de osteopontina) sin alterar la respuesta presora del sistema, lo que disminuiría el daño vascular en este modelo (Alec D. Weisberg y cols, 2005).

El PAI 0-39 tiene una biodisponibilidad oral excepcional, es metabólicamente estable, con amplia seguridad toxicológica testada en múltiples estudios animales, y es fácil de sintetizar en grandes cantidades. Estas características químicas y fisiológicas, unidas a su única actividad profibrinolítica sin asociación a sangrado, hace de él un excelente candidato para su desarrollo clínico (Hassan Elokda y cols, 2004).

Como hemos planteado, estos inhibidores del PAI, además del potencial para la prevención de la enfermedad trombótica y aterosclerótica podrían ser útiles en la prevención y tratamiento de otros procesos como el cáncer invasivo o la fibrosis inducida por quimioterapia. En este trabajo pretendemos aplicarlos a un campo nuevo hasta ahora como es el estudio y el tratamiento de la endometriosis. Para poder evaluar esta posibilidad se precisa de un modelo adecuado que reproduzca tan fisiológicamente como se

posible dicha enfermedad. Las ventajas e inconvenientes de los modelos existentes a tal fin se desglosan en el siguiente apartado.

1.4 Modelos animales para el estudio de la endometriosis

Existen numerosos grupos de investigación inmersos en el estudio de nuevas terapias, haciendo uso de modelos animales (Delgado-Rosas y cols, 2011; Becker CM y cols, 2006; Ricci AG y cols, 2011; Ozer H y cols, 2013). Dentro de estos, los más atractivos como veremos posteriormente son los modelos murinos que permiten el seguimiento no invasivo del desarrollo de la enfermedad.

A pesar de que la endometriosis sólo aparece de manera espontánea en algunos primates (entre ellos los humanos), puede ser inducida en roedores. Las ventajas que presentan los modelos en roedores son su bajo coste, el gran conocimiento de la biología de estos animales, la facilidad para inducir lesiones similares a la endometriosis, la posibilidad de usar animales transgénicos y la capacidad de realizar ensayos con un alto número de individuos. (Becker y cols, 2006; Fortin M y cols, 2004; Fortin M y cols, 2003). Sin embargo también cuentan con una serie de inconvenientes, como son las diferencias en la fisiología de la reproducción (ausencia de ciclo menstrual entre otras), la lejanía filogenética con nuestra especie y la posibilidad de que los fármacos evaluados tengan distintos efectos en roedores que en humanos. En función de cómo induzcamos dicha

enfermedad, hablaremos de modelos homólogos o heterólogos, los cuales describiremos a continuación.

1.4.1 Modelos murinos heterólogos

Los modelos heterólogos se obtienen al implantar, en un animal inmunodeprimido, una porción de biopsia endometrial de una donante de origen humano. Aunque la tasa de implantación ronda el 30%, esta puede elevarse al 100% cuando los implantes son cosidos o pegados. Este dato es importante si se van a realizar ensayos con posibles fármacos, ya que si el número de lesiones es diferente entre los animales testados, los resultados pueden verse comprometidos (Grummer R y cols, 2001).

Tradicionalmente, los ratones más ampliamente utilizados en este tipo de estudios han sido los atímicos (Nude-NU), que carecen de células T maduras. Sin embargo, a pesar de ser ratones inmunodeprimidos, los implantes no son capaces de progresar más allá de la cuarta semana, ya que a partir de la tercera semana se pueden observar linfocitos en el tejido extraño (Grummer R y cols, 2001). Con el fin de evitar estos problemas, se han empleado ratones con un sistema inmune todavía más deprimido, como son los ratones SCID (severe combined immunodeficient) o los ratones (NOD)-SCID (non-obese diabetic severe combined immunodeficient), que carecen tanto de células T como de células B funcionales. En estos ratones severamente inmunodeprimidos, la tasa de implantación es mayor que en los ratones atímicos y los implantes son funcionales durante más de

4 semanas (Grummer R y cols, 2001) Posteriormente, se desarrollaron los ratones NOD/SCID/ γ Cnull(NOG) que son además deficientes en células NK. Con este modelo, el grupo de Matsuda-Sawada, consiguió inducir un ciclo menstrual de 28 días mediante el suministro de hormonas a ratonas ovariectomizadas (Matsuura-Sawada R y cols, 2005). Por otra parte, en 2004, Greenberg y Slayden utilizaron un ratón knockout [RAG-2/ γ (c)KO] deficiente tanto en linfocitos B y T como en células NK funcionales. En este modelo fueron capaces de inducir endometriosis y además mimetizar cuatro ciclos menstruales consecutivos mediante la administración de estrógenos y progesterona (Greenberg LH, Slayden OD, 2004). Este tipo de modelo se emplea principalmente para testar compuestos farmacéuticos y para estudiar la angiogénesis de las lesiones endometriósicas. Entre las ventajas que presentan frente a los modelos homólogos se encuentran el uso de endometrio humano para el desarrollo de las lesiones y la capacidad para realizar estudios más o menos largos. Sin embargo, no hay que olvidar que se trata de ratones inmunodeprimidos, lo que puede afectar al desarrollo de la enfermedad.

Recientemente el empleo de modelos heterólogos se ha popularizado a raíz de la introducción de la monitorización no invasiva de los mismos gracias al uso de fluorescencia inducida por la infección del tejido previo a su implantación con virus modificado genéticamente a tal fin. La principal limitación de estos animales es que al carecer de sistema inmune completo no permiten evaluar en su total complejidad el papel que el sistema inmunitario pudiera tener

sobre la endometriosis. A fin de paliar tal limitación se han desarrollado modelos inmunocompetentes como los que mencionamos a continuación.

1.4.2 Modelos murinos homólogos

Los modelos homólogos para endometriosis se obtienen al implantar una pequeña porción de cuerno uterino murino en la cavidad peritoneal o en el asa intestinal del mismo animal o de un individuo singénico. Ambos animales (donante y receptor) deben ser ovariectomizados y tratados con estrógenos a fin de que no haya diferencias estrogénicas entre ellos. Para estos estudios se utilizan animales inmunocompetentes. Este tipo de modelo se ha desarrollado con ratas, ratones, hámsters y conejos, aunque se han empleado con mayor frecuencia los dos primeros. Entre las ventajas con las que cuentan los modelos homólogos para endometriosis se encuentra la capacidad de emplearlos para estudios largos (ya que no presentan rechazo a los implantes) y la no dependencia de las donaciones de endometrio. Por otra parte, uno de los principales inconvenientes que presenta este tipo de modelos es que el endometrio no suele separarse del miometrio para realizar los implantes, por lo que al evaluar el tamaño y el peso de las lesiones producidas, la presencia del miometrio puede distorsionar los resultados. Además la expresión de citoquinas y quimoquinas de los implantes endometriósicos es similar a la de la endometriosis humana (Umezawa M y cols, 2012). Otro de

los inconvenientes serían lo poco fisiológico que resultan en comparación con el humano por dos características como son:

- La necesidad de aporte exógeno de estradiol para mantener el implante dado que estos animales están ovariectomizados.
- Los roedores no menstrúan sino que tiene ciclos estrales de descamación, a diferencia de lo que ocurre en el humano.

Algunas de las desventajas de los modelos homólogos han sido superadas recientemente en un trabajo de Modelo homólogo mejorado o actualizado (Cheng y cols, 2011). En dicho modelo un tejido más parecido al menstruante es generado gracias a la inducción de la deciduización en útero murino. Posteriormente este tejido pseudodeciduizado de ahora en adelante conocido como pseudo-menstruante, es el que será implantado en los receptores. En dicho estudio Charnock-Jones (Cheng y cols, 2011) evidenció que cuando así se producía, el tejido implantado podría sobrevivir sin necesidad de aporte exógeno de estradiol tan sólo con las variaciones cíclicas endógenas del primo animal receptor. Si bien la monitorización no invasiva todavía no se he ensayado en este modelo animal, no es difícil imaginar que podría realizarse de igual modo al existente en el modelo heterólogo, lo cual la hace todavía más atractiva. Por todas estas características que más lo asemejan a la fisiología humana, este modelo de Charnock será el que utilizemos en nuestro estudio tal y como se describirá posteriormente.

1.5 Justificación del uso de modelo homólogo y del PAI-039 para evaluar el papel de la inhibición del PAI en endometriosis en el presente trabajo

Llegados a este punto ya contamos con todos los elementos necesarios para plantear el estudio de nuestro interés como son:

- a) Una hipótesis de trabajo atractiva: Atendiendo a los estudios sobre la expresión del sistema fibrinolítico en condiciones patológicas de endometriosis así como a los resultados obtenidos en el trabajo de Gomez y cols, sobre el efecto de la quinagolida en la reducción de lesiones endometriósicas, se hipotetiza que la inhibición del PAI y por tanto la potenciación de la fibrinólisis endógena tendría un papel beneficioso sobre las mismas.
- b) un modelo animal adecuado: Para llevar a cabo el estudio existen actualmente modelos animales homólogos inmunocompetentes en los que se podría potencialmente realizar una monitorización no invasiva de las lesiones de endometriósicas desarrolladas para que muestren un comportamiento fisiológico más parecido al humano.
- c) un compuesto adecuado para la experimentación funcional: En este sentido para demostrar nuestra hipótesis disponemos de varias sustancias capaces de inhibir el PAI entre las cuales hemos seleccionado el PAI-039 por tratarse de uno de los inhibidores más potentes y mejor estudiados en modelo in vivo hasta la fecha: además de una excelente biodisponibilidad oral, presenta una amplia

seguridad toxicológica, buena farmacocinética y facilidad para sintetizarlo en grandes cantidades.

Con todo ello ya estamos listos para formular la hipótesis de trabajo sobre la que se asienta esta tesis tal y como detallamos a continuación.

2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO

Planteamos que la inhibición del PAI (inhibidor del activador del plasminógeno) y por tanto la potenciación de la fibrinólisis endógena tendría un papel beneficioso sobre la endometriosis una vez bien establecidas las lesiones.

3.- OBJETIVOS

- **OBJETIVO PRINCIPAL:** Evaluación del papel terapéutico de la inhibición del PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno) en el tratamiento de la endometriosis en un modelo animal murino homólogo mediante determinación de su efecto sobre el tamaño de las lesiones.

- **OBJETIVO SECUNDARIO:** Evaluar si las acciones de inhibición del PAI-1 cursan con afectación de la angiogénesis, el tamaño de la matriz extracelular y el reclutamiento de macrófagos.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

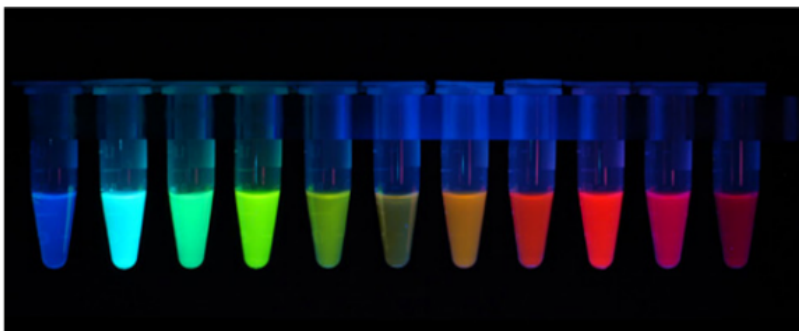
Quisiéramos esbozar brevemente el **diseño experimental** seguido para acometer nuestros objetivos a fin de que el lector pueda ubicar con mayor precisión la racionalidad de los protocolos experimentales que se describen en este apartado:

Para llevar a cabo nuestro proyecto se implantó en tejido subcutáneo de ratones hembra (n=9) inmunocompetentes 1 fragmento de tejido endometrial obtenido de ratones hembra de la misma cepa previamente marcado con proteína fluorescente mcherry. Durante el curso de 15 días (D8 al D21) se les administró a los animales triplaxtinin como compuesto inhibidor de PAI-1 o placebo y se monitorizó de manera no invasiva el tamaño de los fragmentos a partir de la cuantificación de la fluorescencia emitida por la proteína de marcaje. La monitorización de la señal se llevó a cabo mediante un aparato IVIS acoplado a un aparato de anestesia inhalatoria. La cuantificación de la señal se determinó mediante software de J image asociado al Carestream. Al finalizar la monitorización se procedió al sacrificio de los animales y obtención de las lesiones endometriósicas y muestras de sangre. Se procedió a identificar mediante ELISA las concentraciones y actividad de PAI-1 en sangre a fin de verificar la actividad del inhibidor de PAI-1 administrado. En cuanto a las lesiones se sometieron a inmunohistoquímica a fin de identificar marcadores específicos de vascularización (CD31), proliferación (Ki-67), apoptosis (TUNEL), macrófagos (F4/80) y colágeno (KN). Las señales obtenidas fueron cuantificadas objetivamente mediante software de análisis de imagen específico (Image proplus) utilizando macros previamente utilizadas por nuestro grupo (Gomez y cols,

2011). La existencia de diferencias significativas entre los dos grupos fue evaluada estadísticamente mediante tests paramétricos o no paramétricos atendiendo a la distribución homogénea o no de los datos obtenidos.

4.1 Marcaje celular mediante adenovirus recombinante

Una manera actual ampliamente utilizada para marcar células de interés para su posterior localización o seguimiento consiste en la introducción en las mismas de genes que codifican para proteínas fluorescentes, como es el caso de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés Green Fluorescent Protein), todas las derivadas de la misma (CFP, del inglés Cyan Fluorescent Protein; YFP, del inglés Yellow Fluorescent Protein) y mCherry entre otras.



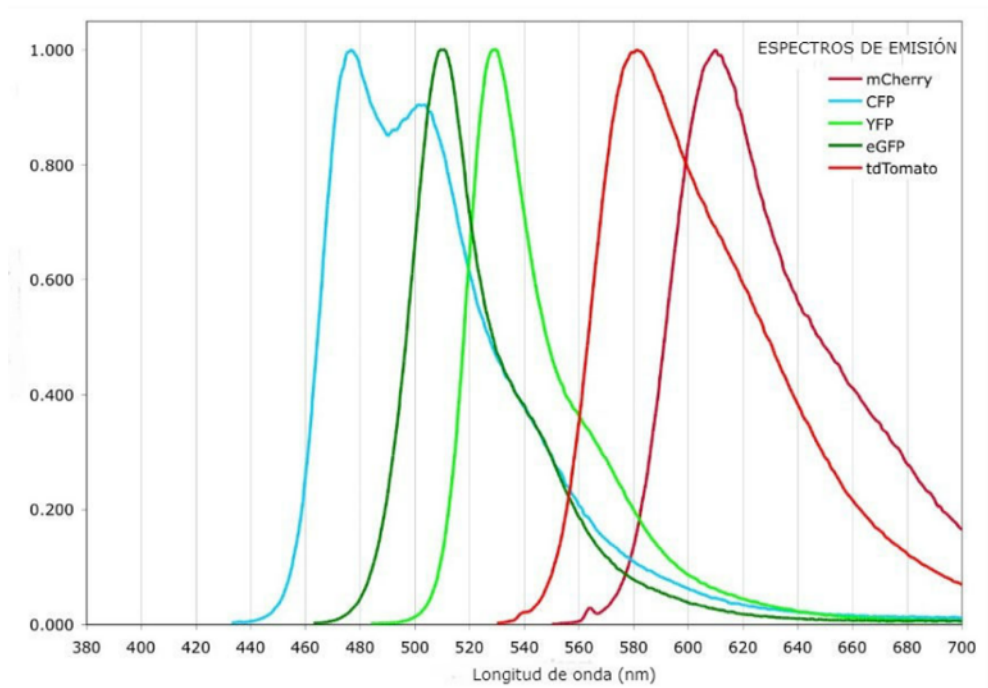


FIGURA 4.1 Ejemplos de proteínas fluorescentes empleadas. A) Se muestra la fluorescencia debida a distintas proteínas fluorescentes. B) Se muestran los espectros de emisión de 5 de las proteínas fluorescentes más empleadas en el campo de la investigación.

Existen básicamente tres técnicas de transferencia génica en células de mamífero:

- El método del fosfato cálcico: Se utiliza principalmente cuando se busca una expresión transitoria del gen de interés, aunque es muy ineficiente.
- La microinyección: Se basa en realizar una fertilización in vitro y en, previamente a la fusión de los pronúcleos, inyectar la

construcción de DNA en el pronúcleo masculino. Se utiliza principalmente para conseguir la expresión de una determinada proteína en todo un organismo.

- Empleo de virus como vectores: Se trata del método más eficaz para la transferencia de genes a células de mamíferos, y es el que se decidió emplear en la presente tesis doctoral, razón por la cual se procede a explicar con más detalle a continuación.

Como parte de su ciclo replicativo, los virus atacan a las células huéspedes introduciendo en las mismas su material genético. Este material genético contiene instrucciones básicas sobre cómo producir más copias virales, secuestrando a la maquinaria celular. Bajo dichas instrucciones las células huéspedes producen copias adicionales del virus que pueden infectar a nuevas células y así sucesivamente. Algunos tipos de virus, de hecho, introducen físicamente sus genes en el genoma de la célula huésped, donde residen hasta el momento de la muerte de dicha célula. Debido a estas particularidades, los virus pueden ser utilizados como vehículos para introducir genes de interés en células humanas, de animales o de plantas. No obstante, dicha explotación de los virus como vectores de genes requiere de la modificación genética del genoma viral para eliminar todos aquellos genes responsables de la patogenicidad de los mismos. Dichos genes, son reemplazados por los genes de interés, es decir, aquellos genes que una vez dentro de la célula diana producen el efecto o efectos deseados (por ejemplo, la expresión de una proteína fluorescente por parte de la célula diana).

Actualmente, los dos tipos de virus más ampliamente utilizados como vectores son los retrovirus y los adenovirus, si bien otros virus pueden ser utilizados con tal fin (virus adeno-asociados, lentivirus, herpes virus, etc.). Los adenovirus son capaces de infectar células en división y células en no división y no integran sus genes en el genoma celular. Estas características determinan que se utilicen como vectores para introducir genes de interés en células en división y en no división cuando se desea una expresión transitoria de dichos genes en la célula diana. Los retrovirus, por su parte, sólo son capaces de infectar a células en división e integran sus genes en el genoma celular, por lo que su empleo como vectores lleva a una expresión estable del gen o genes de interés en la célula huésped.

En esta tesis doctoral se ha recurrido al empleo de un vector adenoviral de tipo 5 en cuyo genoma ha sido introducido el gen que codifica para mCherry, una proteína fluorescente roja. Estos vectores virales han sido empleados para conseguir el marcaje fluorescente de tejido endometrial “menstruante” murino, marcaje que posibilita su *seguimiento in vivo*.

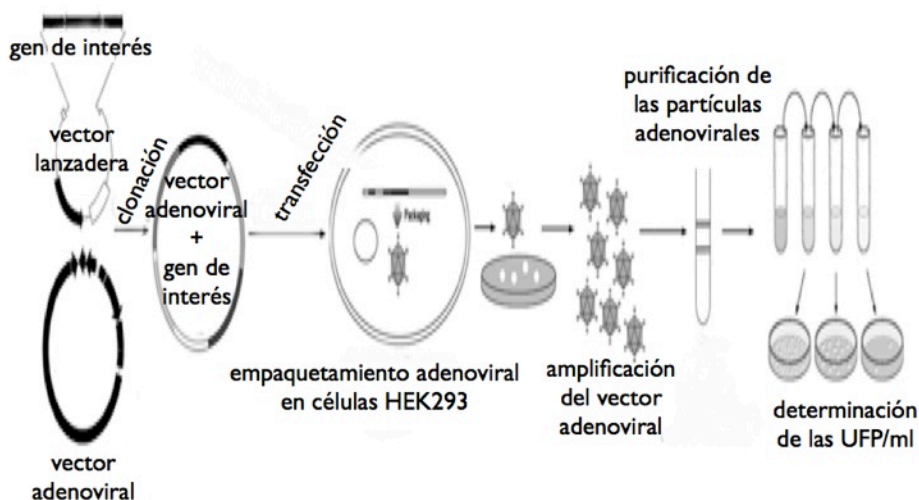


FIGURA 4.2 *Proceso de construcción de vectores adenovirales.*

Imagen modificada de la página web www.vectorbiolabs.com

4.1.1 Amplificación del adenovirus recombinante Ad-mCherry

En primer lugar, se sembraron células HEK293 FT (Invitrogen) en frascos de cultivo T175 con medio DMEM-F12 conteniendo un 10% de suero fetal bovino, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales MEM (Invitrogen), 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen), 1 nM de piruvato sódico MEM (Invitrogen), 500 µg/ml de geneticina (Invitrogen) y 6 mM de L-Glutamina (Invitrogen). En dicho medio se incubaron durante 24-48 h a 37 °C hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. A continuación, se reemplazó el medio de

cultivo por medio fresco con el adenovirus Ad-mCherry (1767, Vector biolabs), a una concentración de 5-10 UFP/célula. Se incubaron las células durante 3-4 días a 37 °C, observando los efectos citopáticos, así como el grado de levantamiento de las células, dos veces por día. Cuando el 80% de las células se habían despegado, la suspensión se transfirió a tubos limpios y se centrifugó a 100 g durante 5 min a temperatura ambiente (TA), almacenándose el sobrenadante a -20 °C. El pellet se resuspendió en un volumen final de 10 mL y se lisaron las células del mismo mediante tres ciclos consecutivos de congelación-descongelación. Finalizados estos tres ciclos, las células se centrifugaron a 800 g durante 10 min para precipitar los restos. Se descartó el pellet y se recolectó el sobrenadante, que se alicuotó y se guardó a -20 °C.

4.1.2 Determinación de la concentración de partículas víricas infectivas

.....

Para establecer la concentración de partículas víricas infectivas tras la amplificación del Ad-mCherry se empleó el *QuickTiter Adenovirus Titer ELISA Kit* (Cell Biolabs) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se suspendieron células HEK293 FT en medio de cultivo y se sembraron en una placa de 96 pocillos en la que se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 1 h. A continuación, se prepararon diluciones seriadas de un control positivo Ad-β galactosidasa y del Ad-mCherry amplificado en el paso anterior, y se

añadieron a los pocillos de la placa, incubándola a 37°C y 5% de CO₂ durante 2 días. Para asegurar la exactitud de las medidas, cada dilución se ensayó por duplicado. Tras dicha incubación, se desechó el medio y las células se fijaron añadiendo metanol frío e incubando 20 min a -20 °C. Posteriormente, se realizó un bloqueo de 1 h con 1% de BSA en PBS a TA y en agitación. Finalizado dicho bloqueo, se realizó una incubación de 1 h a TA y en agitación con un anticuerpo frente a los hexones de los adenovirus. Seguidamente, se incubó con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 h a TA y en agitación. Por último, se añadió a los pocillos tetrametil bencidina atemperado y se incubó durante 5-10 min, deteniéndose la reacción con la solución de *stop* y midiendo la densidad óptica a 450 nm en cada uno de los pocillos. La concentración de partículas virales infectivas se determinó a partir de la curva estándar construida con los valores de absorbancia de las distintas diluciones del Ad-β-galactosidasa empleado como control positivo.

4.2 Experimentación animal

La experimentación animal se realizó en el estabulario autorizado de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, de acuerdo con la normativa vigente y respetando los procedimientos de manejo y sacrificio recomendados por las legislaciones española y europea (Real Decreto 1201/2005, B.O.E. 252, 10 de Octubre de 2005

y el Convenio Europeo 1-2-3, 18 de marzo de 1986). Los procedimientos de experimentación fueron acordes con los Principios del Cuidado de Animales de Laboratorio (National Institutes of Health, NIH; publicación nº 85-23, revisado en 1985).

Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad), temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa ($55 \pm 10\%$), con libre acceso a comida (en formato pellet) y bebida.

Se utilizaron ratones hembra de 6-7 semanas de edad de la cepa B6N-Tyr^{c-Brd}/BrdCrCrI (aproximadamente 20-25 g), una cepa albina derivada de la cepa C57Bl/6 por mutación espontánea. Los ratones de esta cepa poseen en homocigosis una mutación en el gen de la tirosinasa que es la responsable de que sean albinos en lugar de negros. Al igual que la C57Bl/6, es una cepa inmunocompetente (sistema inmune intacto) e isogénica (los individuos de la misma son prácticamente idénticos genéticamente).



FIGURA 4.3 Ratón de la cepa B6N-Tyr^{c-Brd}/BrdCrCrI. Imagen sacada de la página web oficial de Charles River.

El hecho de tratarse de una cepa albina e isogénica fue el que determinó la elección de esta cepa, pues ambas características son fundamentales para establecer un adecuado modelo homólogo no-invasivo. Así, por un lado, el alotrasplante necesario para establecer el modelo murino homólogo requiere del empleo de una cepa isogénica, para evitar el rechazo de los implantes. Por otro lado, la pigmentación de la piel (ausente en los ratones albinos) enmascara en gran medida cualquier señal fluorescente existente por debajo de la piel (es decir, actúa como barrera para la detección de una señal fluorescente más profunda), por lo que el empleo de una cepa albina permite mejorar la monitorización de la señal fluorescente de los implantes.

4.2.1 Obtención de tejido endometrial “menstruante” de ratonas donantes

.....

Se ovariectomizaron 22 ratones hembra de la cepa B6N-Tyr^{c-Brd}/BrdCrCrI de 6-7 semanas de edad adquiridas en *Charles River*. Dicha intervención se hizo bajo anestesia inhalatoria (5% isoflurano para inducción, y 2% para mantenimiento), previa administración de analgesia (buprenorfina, 0,1 mg/kg), con el fin de reducir al mínimo el sufrimiento animal. Una semana después de la ovariectomía y con el fin de inducir un ciclo menstrual, estas ratonas fueron sometidas al tratamiento hormonal con estradiol (E₂, Sigma-Aldrich, Inc.) y progesterona (P₄, Sigma-Aldrich, Inc.) descrito en la *Tabla 4.1*. La

decidualización del endometrio característica del ciclo menstrual se mimetizó mediante la inyección de aceite mineral en el útero de los animales. Esta inyección se hizo mediante cirugía, anestesiando a los animales con isoflurano (previa inyección de analgesia) y realizándoles una incisión en la piel (en la parte abdominal) y dos incisiones en peritoneo para acceder a cada uno de los cuernos uterinos. En la inyección empleó una aguja de calibre 27G, inyectándose 20 μ l de *Peanut Oil* (Sigma-Aldrich, Inc.) en cada uno de los cuernos uterinos de cada animal.

Transcurridas 60 h desde la inyección de E₂+P₄ del D8, las ratonas sujetas al tratamiento descrito se sacrificaron y se les extrajo el útero. El tejido endometrial “menstruante” se obtuvo frotando suavemente con unas pinzas curvas los dos cuernos de dichos úteros y se recogió en un pequeño volumen de medio DMEM-F12 con antibióticos (medio DMEM-F12, 10% suero fetal bovino, 1 μ g/mL fungizona y 1% penicilina/estreptomicina), conservándose en hielo hasta el momento de la infección viral.

D1	D2	D3	D3-D5	D6	D7	D8	D9	D10

TABLA 4.1 Esquema del protocolo seguido para obtener el tejido endometrial “menstruante”. Las inyecciones de E₂ se hicieron empleando una aguja de calibre 30G, mientras que las de progesterona se hicieron con una aguja de calibre 27G (pues ésta se hallaba disuelta en aceite vegetal, de mayor viscosidad que el suero fisiológico)

4.2.2 Marcaje del tejido endometrial “menstruante”

El tejido endometrial “menstruante” obtenido se marcó fluorescentemente para su seguimiento *in vivo*. Dicho marcaje se realizó incubando el tejido con el Ad-mCherry en medio DMEM-F12 sin antibióticos (medio DMEM-F12 con un 10% suero fetal bovino) a una concentración de $1 \cdot 10^8$ UFP/ml durante 8 h a 37 °C, 5% de CO₂ y en agitación. Tras dicha incubación, el tejido se lavó con medio DMEM-F12 y se chequeó el marcaje fluorescente del mismo mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio Leica EL6000.

4.2.3 Trasplante del tejido endometrial “menstruante” a las ratonas receptoras

Una vez marcado, el tejido endometrial se dividió en 9 fracciones del mismo tamaño y se trasplantó subcutáneamente en 9 ratonas de la misma cepa que las donantes (B6N-Tyr^{c-Brd}/BrdCrCrI), a razón de una fracción por animal. Para realizar dicho trasplante, los animales fueron anestesiados mediante isoflurano (tal y como se ha indicado anteriormente) y se les realizó un bolsillo subcutáneo en la parte dorsal en el que se depositó el tejido endometrial marcado con la ayuda de unas pinzas.

4.2.4 Monitorización de la fluorescencia

El seguimiento *in vivo* de los implantes se realizó dos veces por semana durante los 21 días posteriores al trasplante. Para dicho seguimiento se empleó el equipo Carestream *In vivo* FX-PRO (Bruker) excitando durante 40 segundos a una longitud de onda de 550 nm y registrando a 600 nm. Previamente al registro de la fluorescencia, se depiló la zona donde se encontraba el implante haciendo uso de una crema depilatoria (Veet). Además, para la monitorización se emplearon unas plantillas negras adhesivas que solo dejaban al descubierto la zona del implante con el fin de monitorizar mejor la señal fluorescente.

4.2.5 Tratamiento con inhibidor de PAI-1

Parte de las ratonas receptoras (grupo tratado) fueron tratadas con el inhibidor de PAI-1 conocido como tiplaxtinin o PAI-039 (Axon biochem). Dicho inhibidor se reconstituyó en DMSO (Sigma-Aldrich, Inc.) y se disolvió en agua autoclavada para su administración oral mediante sonda a una dosis de 300 µg/día. Dicho tratamiento se inició 8 días después del trasplante (momento en el que se espera que los implantes estén ya establecidos) y se prolongó hasta el momento del sacrificio de los animales (D21). Al grupo control se le administró el vehículo (DMSO) disuelto en agua autoclavada.

El área y la intensidad de fluorescencia detectada *in vivo* a lo largo de este tratamiento se calculó haciendo uso del programa Image J.

4.2.6 Sacrificio y recogida de muestras

Antes del sacrificio, y previa anestesia de los animales, se obtuvo una muestra de sangre de todas las ratonas receptoras mediante punción cardíaca. Inmediatamente después de su recolección (en 0,1 M de citrato trisódico; 1 volumen por cada 9 de sangre), las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3000 g durante 15 minutos, tras lo cual se recolectó el plasma y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Las ratonas se sacrificaron por dislocación cervical, y se recogieron los implantes, comprobándose la fluorescencia de los mismos mediante el equipo de visualización *in vivo* anteriormente indicado. Estos implantes fueron fijados en paraformaldehído (PFA) 4% (BDH Prolabo) para su posterior análisis histológico.

4.3 Análisis histológicos

4.3.1 Inclusión en parafina

Los implantes sumergidos en PFA 4% se pasaron a una solución de etanol 70% 24 h después de su recogida. Una vez fijados, se incluyeron en parafina (Panreac), previa deshidratación mediante sucesivos pases por concentraciones crecientes de etanol y xilol (Merck), tal y como se muestra en la *Tabla 4.2*. Posteriormente,

empleando un microtomo de rotación HM-340E (Microm), se realizaron cortes seriados de 4 μm que se adhirieron a portaobjetos *SUPERFROST® PLUS* (Thermo Scientific).

TABLA 4.2 Pases realizados para la inclusión de las muestras en parafina

Reactivo	Tiempo (min)
Etanol 70%	60
Etanol 96%	60
Etanol 96% II	60
Etanol 100% I	60
Etanol 100% II	60
Etanol 100 % III	60
Xilol I	20
Xilol II	20
Xilol III	20
Parafina I	60
Parafina II	60

4.3.2 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en parafina

.....

La inmunohistoquímica es una técnica empleada para la detección de antígenos (por ejemplo, proteínas) en secciones de tejido basada en la reacción antígeno-anticuerpo. Su nombre deriva de las raíces “inmuno”, en referencia al empleo de anticuerpos, e “histo”, debido a que se aplica a secciones de tejido (a diferencia de la inmunocitoquímica).

Aunque existen distintos métodos inmunohistoquímicos el más comúnmente empleado es aquel en el que se utilizan un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario marcado (método indirecto). Brevemente, en este método, tras desenmascarar el antígeno y bloquear las uniones inespecíficas, las secciones tisulares se incuban con un anticuerpo que reconoce específicamente al antígeno de interés (anticuerpo primario). Dicho anticuerpo queda, por ello, unido únicamente en aquellos sitios de la sección tisular donde se encuentra el antígeno de interés. A continuación, se añade a las secciones un anticuerpo que reconoce la fracción constante de los anticuerpos de una determinada especie (aquella en la que ha sido producida el anticuerpo primario). Este segundo anticuerpo se conoce generalmente como anticuerpo secundario y se caracteriza por ir conjugado a una enzima, en general la peroxidasa de rábano (HRP). Este anticuerpo se une a la fracción constante del anticuerpo primario empleado, formando una especie de *sandwich*. El revelado se realiza mediante diaminobenzamida (DAB), que es convertida por la HRP en un precipitado marrón. El resultado es el marcaje marrón de aquellas zonas del tejido donde se encuentra la molécula de interés.

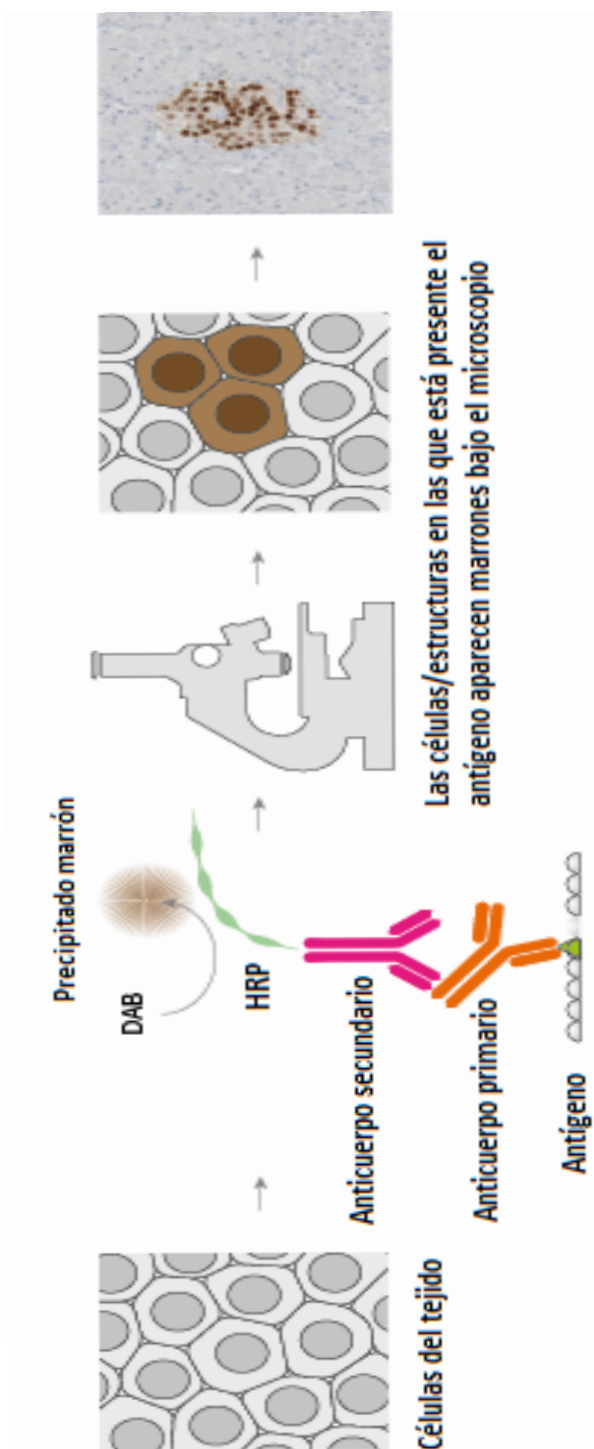


FIGURA 4.4 Explicación fundamental inmunohistoquímica.

Con el objetivo de amplificar la señal, se puede sustituir el empleo de anticuerpos secundarios directamente conjugados a la enzima de revelado por el empleo de anticuerpos secundarios conjugados a moléculas de biotina y moléculas de estreptavidina conjugadas al enzima de revelado.

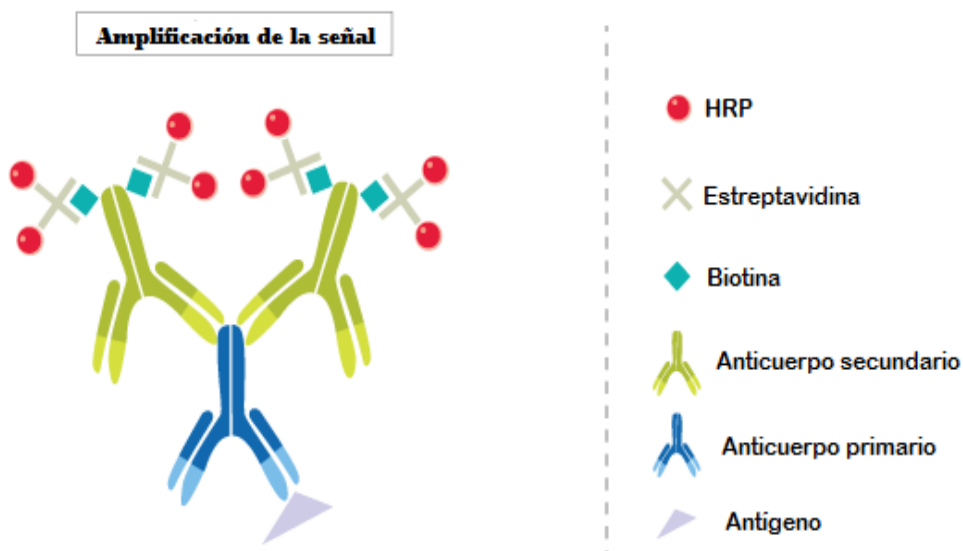


FIGURA 4.5 Fundamento de la amplificación de la señal basada en biotina-estreptavidina

En el caso de emplear un anticuerpo primario o secundario conjugado a un fluorocromo en lugar de a un enzima como la HRP, la misma técnica pasa a denominarse inmunofluorescencia, y la detección del antígeno requiere del empleo de microscopios de fluorescencia. Aunque la técnica de inmunofluorescencia se suele aplicar a secciones de tejido congelado, también es posible aplicarla a secciones de tejido embebidas en parafina tras eliminar adecuadamente la parafina existente.

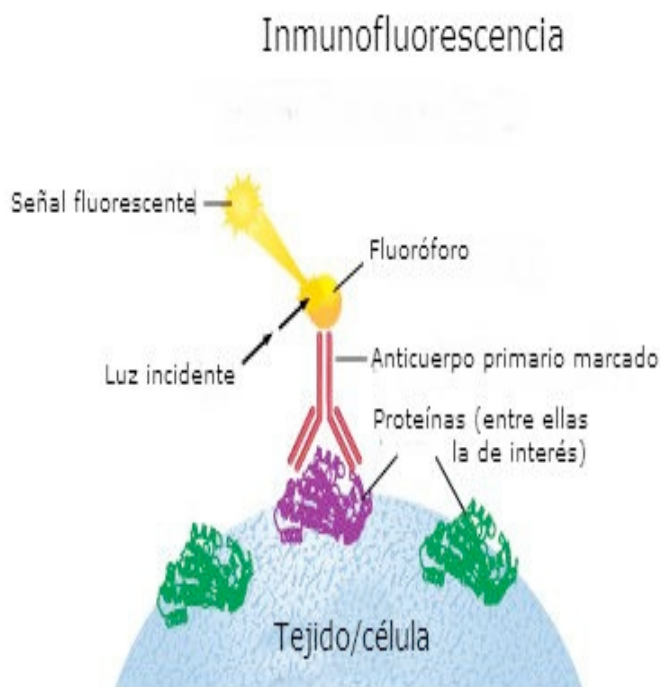
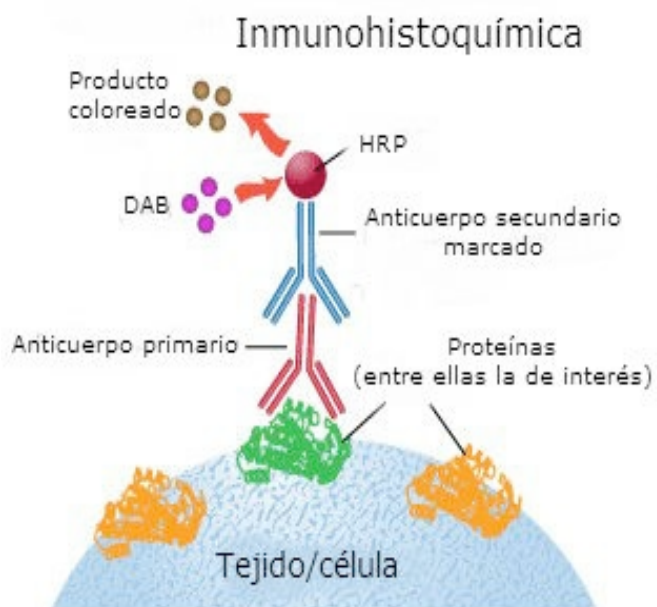


FIGURA 4.6 Inmunohistoquímica vs. Inmunofluorescencia. Se representa el fundamento de estas dos técnicas y diferencias entre ambas.

En esta tesis doctoral se han empleado anticuerpos primarios específicos para las siguientes moléculas de interés (antígenos):

- **CD45.** Receptor ligado a una tirosina fosfatasa que se expresa en todos los leucocitos (y, exclusivamente en este tipo celular) y que juega un papel crucial en la función de estas células.
- **F4/80.** Glicoproteína de superficie celular cuya expresión en ratón se restringe a los macrófagos, razón por la cual se emplea ampliamente como marcador de la población de macrófagos murinos.
- **Citoqueratina.** Proteína fibrosa que forma (junto con otras) los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular de las células epiteliales (incluyendo mucosas y glándulas).
- **Ki-67.** Proteína nuclear asociada y necesaria para la proliferación celular. Se expresa durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) pero no en las células en reposo (G0).
- **α -SMA.** Actina citoplasmática presente en la pared de los vasos maduros y en la lámina muscular y en la lámina propia de la mucosa intestinal.
- **mCherry.** Proteína fluorescente roja derivada de una proteína aislada de *Discosoma sp.* Presenta un pico de absorción/emisión a 587 nm y 610 nm, respectivamente.

- **Fibrina.** Proteína insoluble sintetizada a partir de fibrinógeno. Es el sustrato de la plasmina, la cual degrada las redes de fibrina dando lugar a fibrinopéptidos solubles en un proceso conocido como fibrinólisis.

A continuación se procede a detallar el proceso que se siguió en esta tesis doctoral para detectar en las secciones tisulares las moléculas de interés anteriormente expuestas:

Los cortes se desparafinaron mediante 1h a 60°C y tres pases sucesivos por xilol (de 15 min cada uno), y se hidrataron mediante pases sucesivos por soluciones de etanol en concentraciones decrecientes (100%, 90%, 70%, 50% y H₂O destilada), cada uno de ellos de una duración mínima de 10 min. Tras ello, y a fin de exponer los grupos enmascarados por el aldehído (PFA), las muestras se introdujeron en una solución de 10 mM de citrato de sodio pH 6 (Dako) en un microclave (J.P Selecta) a una presión de 1,5 Bar durante 3 min. Una vez atemperadas, éstas se sumergieron durante 15 min en una solución de Metanol:H₂O₂ (29:1) para bloquear la actividad peroxidasa endógena. A continuación, y con la finalidad de reducir el marcaje inespecífico, las muestras se incubaron durante 1 h en una solución con un 10% de suero perteneciente a la especie productora del anticuerpo secundario correspondiente. Tras este bloqueo, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario correspondiente (*Tabla 4.3*), durante 30-60 min a TA o durante 18 h a 4 °C. Finalizada esta incubación, se realizaron tres lavados con TBST (Dako) y se incubaron a TA durante 1 h con el anticuerpo secundario

conjugado a biotina correspondiente (*Tabla 4.4*). Todos los anticuerpos, tanto primarios como secundarios, se diluyeron en una solución con un 1% de suero perteneciente a la especie productora del anticuerpo secundario. A continuación, las muestras se lavaron tres veces con TBST y se incubaron durante 30 min a TA con el complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC, Vectastain Elite, Vector Laboratories). Para el revelado de la reacción se utilizó un kit de diaminobenzimida como sustrato cromogénico para la peroxidasa (DAB, Vector Laboratories), siguiendo las recomendaciones del proveedor. La reacción química se paró con agua visualizando las preparaciones en un microscopio óptico para determinar el tiempo adecuado de revelado. Para poder contrastar la señal se realizó, a continuación, una tinción suave con hematoxilina y los cortes se deshidrataron mediante pases sucesivos por concentraciones crecientes de etanol (70%, 96%, 100% y 100 %) y por xilol (3 pases).

Finalmente, las muestras se montaron empleando el medio de montaje DePeX (BDH Prolabo) y se analizaron y fotografiaron mediante un microscopio de campo claro Leica DMI 3000B. En todas la inmunohistoquímicas realizadas se incluyó un control negativo del marcaje, el cual no se incubó con el anticuerpo primario correspondiente.

TABLA 4.3 Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Anticuerpo primario	Dilución	Tiempo de incubación
Rat anti-CD45 (R & D)	1:50	18 h a 4°C
Goat anti-mCherry (Biorbyt)	1:100	1h a TA
Rat anti-F4/80 (Abd Serotec)	1:100	1 h a TA
Rabbit anti-Citoqueratina (Dako)	1:100	18 h a 4°C
Rabbit anti-Ki67 (Abcam)	1:500	18 h a 4°C
Rabbit anti-fibrin (Abcam)	1:250	18 h a 4°C
Mouse anti- α SMA (Sigma)	1:200	30 min a RT

TABLA 4.4 Anticuerpos secundarios utilizados en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Anticuerpo secundario	Dilución
Anti-rabbit biotinilado (Vector laboratories)	1:500
Anti-rat biotinilado (Vector laboratories)	1:500
Anti-goat biotinilado (Vector laboratories)	1:500

El análisis de la vascularización en las lesiones se realizó combinando una inmunofluorescencia frente α -sma con el empleo de la isolectina B4 conjugada a fluoresceína (Vector Laboratories FL-1201). Esta isolectina (aislada de *Griffonia Simplicifolia*) se utiliza ampliamente como marcador de células endoteliales de ratón, rata, cabra y conejo al unirse específicamente a una glicoproteína presente en la membrana de estas células en dichas especies y en otras especies no-primates. Brevemente, los cortes se desparafinaron y se hidrataron tal y como se ha detallado anteriormente. A continuación, se realizó el desenmascaramiento antigénico empleando una solución de 10 mM de citrato de sodio pH 9 (Dako) en un microclave (J.P Selecta) a una presión de 1,5 Bar durante 3 min. Una vez atemperadas, las secciones se incubaron durante 30 min a TA con una solución con 1mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 0,05% Tween a pH 7,4. Finalizada esta incubación, las secciones se incubaron 10 min a TA con una solución de 1% BSA y otros 20 min a TA con la solución de 1mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 0,05% Tween a pH 7,4. Seguidamente, se incubaron las secciones con la isolectina B4 (conjugada a fluoresceína) a 20 μ g/ml 18 h a 4°C. Finalmente, las muestras se incubaron con un anticuerpo frente a α -sma conjugado a Alexa 594 (Sigma) durante 30 min y se montaron con medio de montaje con DAPI (Life Technologies) y se analizaron y fotografiaron mediante un microscopio de fluorescencia Leica EL6000.

4.4 Tinción tricrómica

La tinción tricrómica es un tipo de tinción basada en el empleo de tres colorantes que permite visualizar las fibras de colágeno. En primer lugar, se emplea un tinte ácido (generalmente la escarlata de Biebrich), para teñir los elementos acidófilos del tejido, como es el caso del citoplasma, el músculo y el colágeno. En segundo lugar, se emplea ácido fosfotúngstico y/o fosfomolibdico, que hace difundir el tinte ácido del colágeno pero no del citoplasma debido a la menor permeabilidad de este último. Por último, se emplea el azul de anilina, gracias al ácido fosfotúngstico y/o fosfomolibdico, se une al colágeno. De esa manera es posible distinguir entre núcleo celular (teñido de lila-marrón), citoplasma (teñidas de rojo-rosado) y fibras de colágeno (teñidas de azul).

A continuación se procede a detallar el proceso seguido en la presente tesis doctoral para detectar depósitos de colágeno en las secciones tisulares:

Tras desparafinar e hidratar los cortes tal y como se ha indicado en el apartado anterior, éstos se incubaron durante 15 min en una solución de Bouin (Sigma-Aldrich, Inc.), precalentada a 56°C. Trascurrida esta incubación, las muestras se enfriaron, se lavaron con H₂O corriente y se incubaron con una solución de hematoxilina férrica de Weigert (Sigma-Aldrich, Inc.) durante 5 minutos. Seguidamente, los cortes se lavaron con H₂O corriente, se aclararon con H₂O destilada y se tiñeron con fucsina ácida-escarlata de Biebrich (Sigma-

Aldrich, Inc.) durante 5 minutos. A continuación, y previo aclarado con H₂O destilada, los cortes se incubaron durante 5 min en una solución de ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico (1 volumen de ácido fosfotúngstico (Sigma-Aldrich, Inc.) y 1 volumen de ácido fosfomolibdico (Sigma-Aldrich, Inc.) con 2 volúmenes de H₂O destilada), y posteriormente en una solución de azul anilina (Sigma-Aldrich, Inc.) durante otros 5 minutos. Finalmente, se realizó una incubación de 2 min en 1% de ácido acético, y tras aclarar con H₂O destilada, las muestras se deshidrataron y se montaron tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

4.5 Análisis apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que ocurre en los organismos multicelulares. Se desencadena por eventos bioquímicos que llevan a cambios en las características celulares y finalmente a la muerte celular. Entre los cambios celulares característicos de la apoptosis se encuentran el “burbujeo”, el encogimiento celular, la fragmentación nuclear, la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN cromosómico.

A diferencia de la necrosis, que es una forma de muerte celular traumática en respuesta a un daño celular agudo, la apoptosis es un proceso altamente regulado y controlado fundamental en ciertos procesos del desarrollo como lo es la separación de los dedos de las manos y de los pies. Durante la apoptosis, se producen fragmentos

celulares llamados cuerpos apoptóticos que son engullidos rápidamente por células fagocíticas evitando el daño que estos podrían causar en las células circundantes.

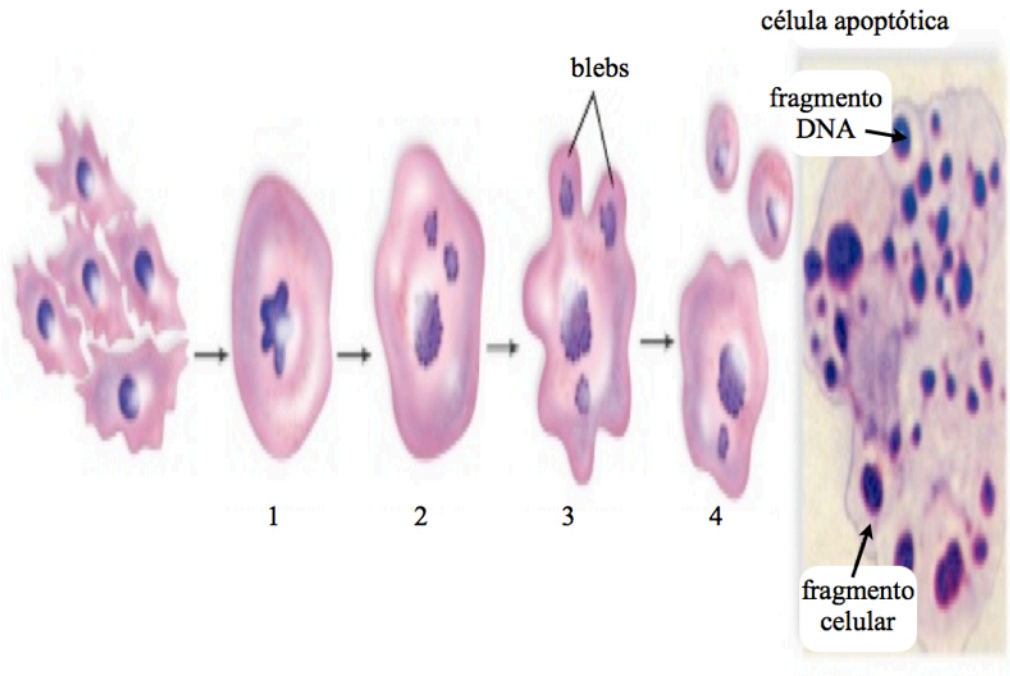
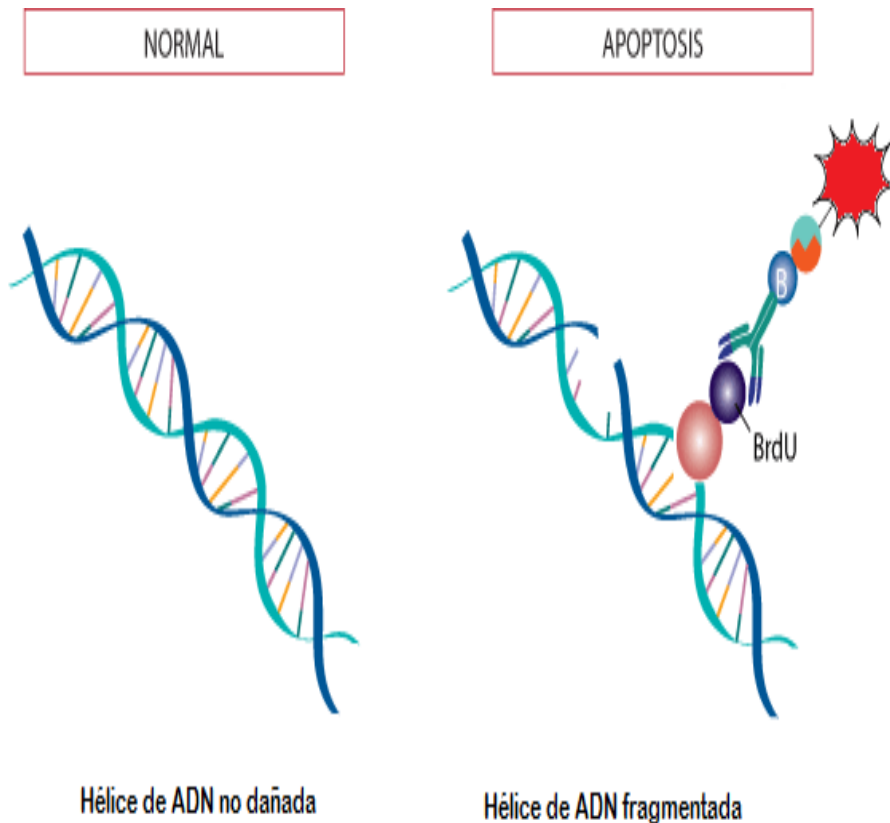


FIGURA 4.7 Representación gráfica del proceso de apoptosis o muerte celular programada: 1) La célula se redondea y el núcleo se colapsa. 2) La cromatina se condensa y el núcleo se fragmenta. 3) La membrana plasmática forma vesículas y se forman ampollas. 4) Fragmentos celulares tienen DNA fragmentado

Una técnica ampliamente utilizada para identificar células en apoptosis es el TUNEL (del inglés Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick end labeling). Mediante esta técnica es posible detectar la fragmentación del ADN consecuencia de las cascadas de señalización apoptótica. El ensayo aprovecha la presencia de mellas en el ADN de las células apoptóticas que pueden ser identificadas mediante el enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal o TdT, un enzima que cataliza la adición de dUTPs marcados a los extremos 3' generados como consecuencia de la fragmentación del ADN.



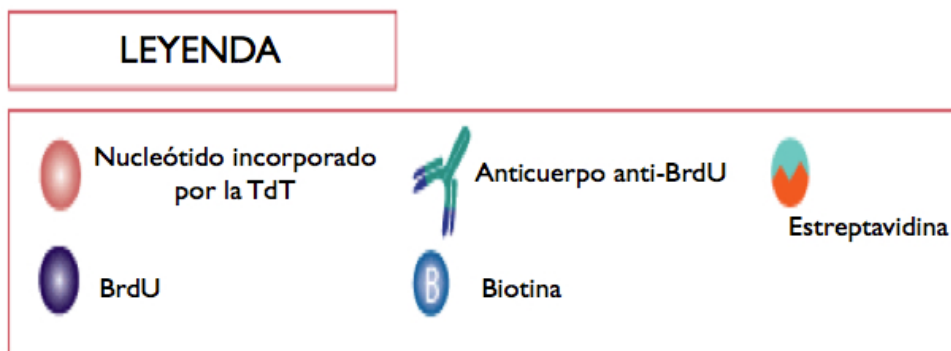


FIGURA 4.8 Fundamento del TUNEL.

En esta tesis doctoral, el análisis de la apoptosis se realizó empleando el kit *In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red* (Roche). Brevemente, tras desparafinar, hidratar y realizar el desenmascaramiento antigénico tal y como se ha indicado en el apartado 3.2, los cortes se incubaron con el mix de TUNEL durante 60 min a 37°C en oscuridad y en cámara húmeda. Este mix consiste en una mezcla de dos soluciones: solución de marcaje, que contiene TMR-dUTP; y solución enzimática, que contiene el enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT). Durante esta incubación la TdT añade moléculas de TMR-dUTP a los extremos 3' generados como consecuencia de la fragmentación del ADN. Finalizada esta incubación, se realizaron dos lavados con PBS, y se montaron las muestras con el medio de montaje *ProLong Gold antifade reagent* con DAPI (Life technologies), tras lo cual se dejaron 18 h a TA. La detección del marcaje se realizó mediante un microscopio de fluorescencia Leica EL6000, excitando a 540 nm y detectando a 580 nm.

Se incluyó un control positivo y un control negativo del marcaje. Como control positivo se empleó un corte de una lesión endometriósica incubado, tras el desenmascaramiento antigénico, durante 10 min con 2000U/ml de DNAsa I (en 50mM Tris + 1mg/ml de BSA, pH 7,5). Como control negativo se empleó un corte de una lesión endometriósica incubado únicamente con la solución de marcaje (sin la solución enzimática).

4.6 Cuantificación

El marcaje obtenido en las inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias se cuantificó haciendo uso del programa Image Pro Plus 6. Concretamente, para cada lesión, se cuantificó el número de células positivas para el marcaje o el área marcada en 4 campos al 20X.

4.7 Concentración de PAI-1 activo y PAI-1 total en plasma

El ensayo ELISA (del inglés Enzyme-linked immunosorbent assay), también conocido como ensayo EIA (Enzyme immunoassay), es una técnica bioquímica utilizada principalmente en el campo de la inmunología para detectar la presencia de un anticuerpo o un antígeno determinado en una o más muestras. Básicamente, en un ensayo ELISA, una cantidad desconocida de antígeno se fija a una superficie (en general, la base de los pocillos de una placa multi-pocillo),

añadiendo posteriormente sobre esa superficie un anticuerpo específico conjugado a un enzima. Dicho anticuerpo reconoce al antígeno y queda así unido también a la superficie. Finalmente, se añade un sustrato que es convertido por el enzima en una señal detectable y cuantificable.

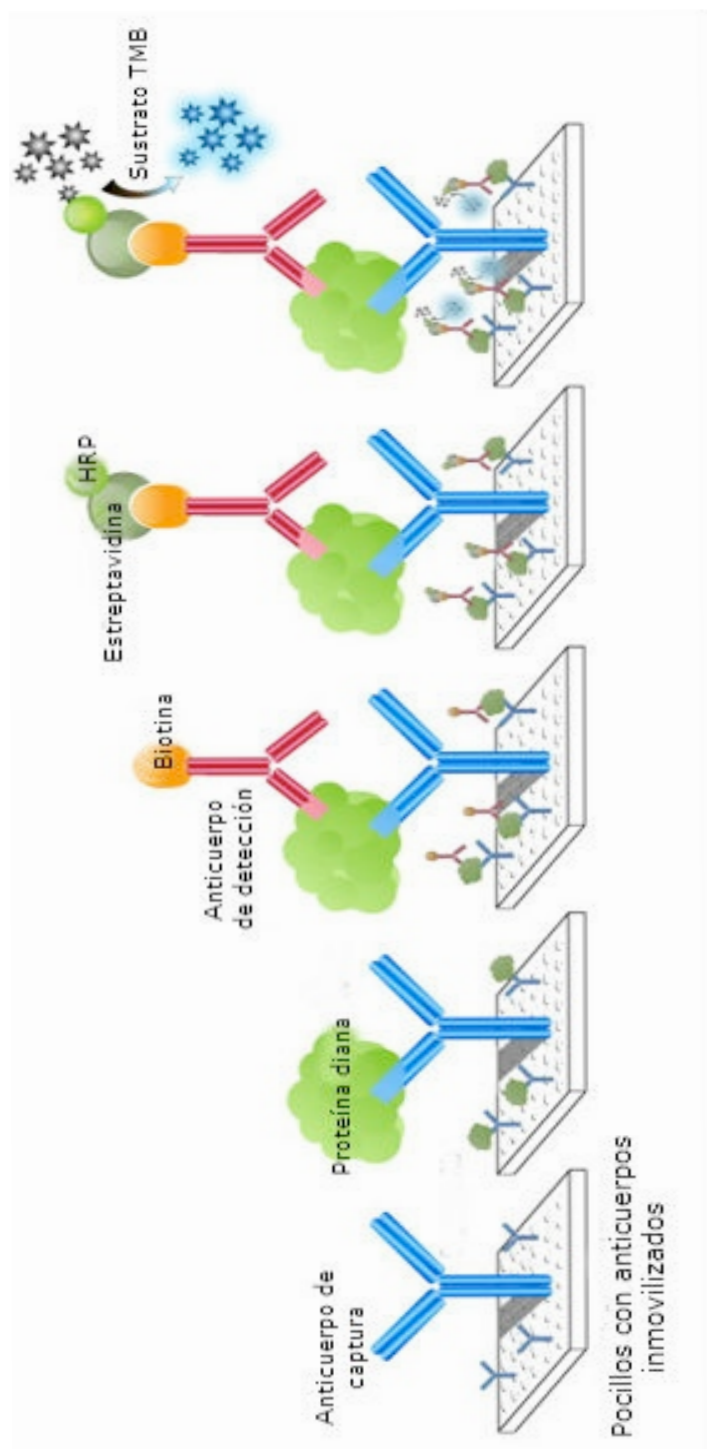


FIGURA 4.9 *Fundamento de la técnica ELISA*

En la presente tesis, la concentración de PAI-1 activo en plasma fue determinada mediante el kit *Active Mouse PAI-1 ELISA Kit* (Innovative Research, Inc.), siguiendo las instrucciones del proveedor. Tras descongelar el plasma recolectado de cada una de las ratonas receptoras, se añadieron 100 µl del mismo (y de los estándares) en pocillos recubiertos de uroquinasa de una placa de 96W, y se incubaron durante 30 min en agitación (a 300 rpm). Durante esta incubación únicamente las moléculas de PAI-1 funcionalmente activas reaccionan con la uroquinasa y quedan retenidas. Tras varios lavados para eliminar las moléculas de PAI-1 no unidas, se añadió a los pocillos un anticuerpo primario frente a PAI-1 (producido en conejo), incubándose la placa durante 30 min en agitación (a 300 rpm). Eliminado el exceso de anticuerpo primario mediante varios lavados, los pocillos se incubaron durante 30 min a 300 rpm con un anticuerpo secundario frente a inmunoglobulinas de conejo conjugado a peroxidasa de rábano. Finalizada esta incubación, y eliminado el exceso de anticuerpo mediante varios lavados, se añadió a los pocillos tetrametil bencidina y se incubó la placa en oscuridad durante 2 min a 300 rpm. La reacción se paró mediante una solución 1N de HCl. Finalmente, se midió la absorbancia de los pocillos a 450 nm mediante el espectrofotómetro SPECTRAmax PLUS 384 (Molecular Devices).

La concentración en cada una de las muestras se calculó mediante extrapolación de su valor de absorbancia en la curva patrón obtenida. Cada muestra, así como cada estándar, se ensayó por duplicado, calculándose posteriormente la media de los duplicados.

Por otra parte, la concentración de PAI-1 total en plasma fue medida mediante el kit *Mouse PAI-1 Total Antigen ELISA kit* (Innovative Research, Inc.). Los pasos seguidos para ello fueron los mismos que para medir la concentración de PAI-1 activo, salvo por el hecho de que los pocillos de la placa empleada en lugar de estar recubiertos por uroquinasa estaban recubiertos por un anticuerpo que reconoce PAI-1 tanto en su estado latente como en su estado activo.

4.8 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa IBM SPSS Statistics 22. Para la elección del test estadístico a emplear se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. En los casos de una variable numérica, una categórica y distribución normal se aplicó un t-test para muestras independientes. En caso de no cumplirse la distribución normal se aplicó un test no paramétrico (Mann-Whitney). En todos los casos, se rechazó la hipótesis nula cuando $p\text{-valor} < 0,05$.

5.- RESULTADOS

5.1 Modelo de endometriosis

Con el objetivo de establecer un modelo murino homólogo no-invasivo de endometriosis 22 ratonas de la cepa B6N-Tyr^c-Brd/BrdCrCl (ratonas donantes) se sometieron al protocolo de inducción de tejido endometrial “menstruante” descrito en el apartado de materiales y métodos (*Figura 4.1 de materiales y métodos*). Tras su sacrificio una vez finalizado el protocolo de inducción de tejido endometrial menstruante, se observó que presentaban úteros de un tamaño, grosor y rojez superiores a los esperados para ratonas de esta cepa, de la misma edad y no sometidas a ovariectomía y posterior tratamiento hormonal (*Figura 5.1A*). El aspecto de los mismos sugería que estos habían sido correctamente decidualizados. El tejido endometrial recolectado de los úteros de estas ratonas, se incubó durante 18 h con un vector adenoviral portador del gen de la proteína fluorescente mCherry, a una concentración de 1×10^8 UFP. Mediante dicha incubación se consiguió un adecuado marcaje fluorescente del tejido endometrial murino (*Figura 5.1B*).

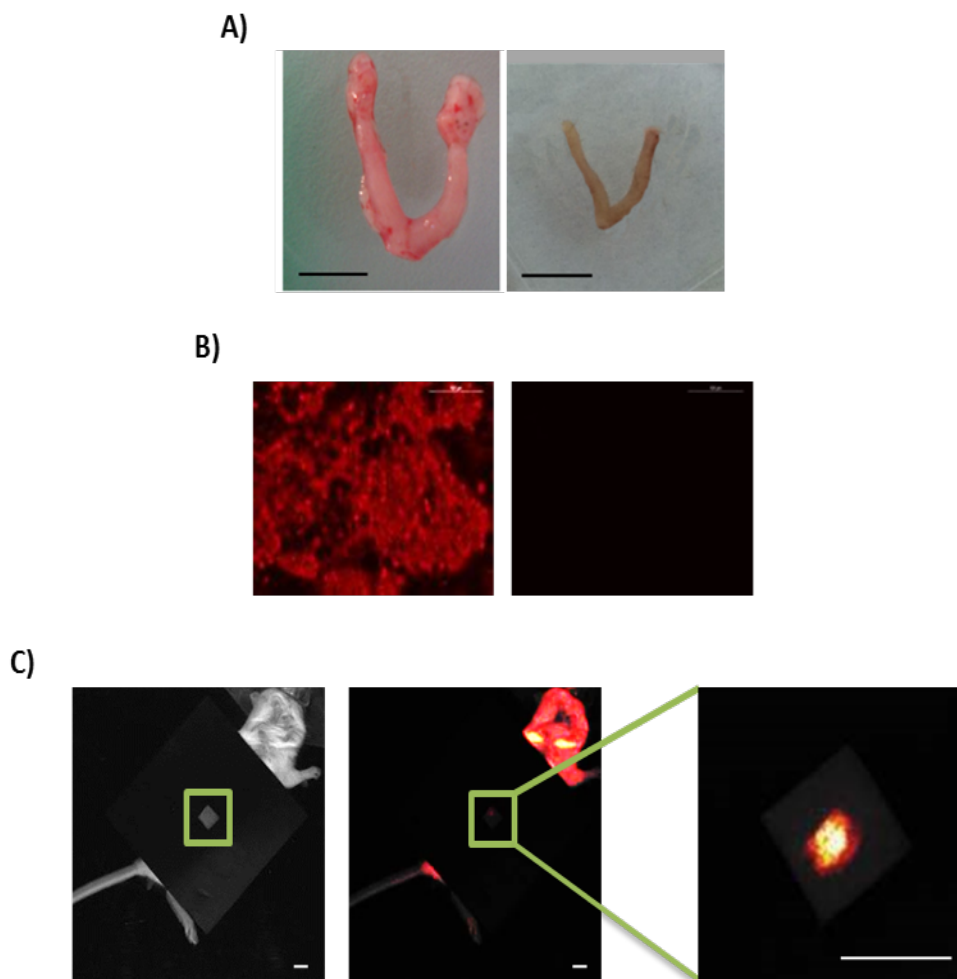


FIGURA 5.1 *Obtención, marcaje y visualización in vivo de tejido endometrial “menstruante” murino. A) Ejemplo de los úteros obtenidos de las ratonas sometidas al protocolo de inducción de tejido endometrial “menstruante” (izquierda) y ejemplo de un útero de una ratona de la misma cepa y edad no sometida a dicho protocolo. La barra negra equivale a 0,5 cm. B) Comprobación del marcaje del tejido endometrial recolectado mediante microscopia de fluorescencia. A la izquierda se muestra tejido endometrial incubado con el vector adenoviral y a la derecha tejido endometrial no*

incubado con el vector adenoviral. C) Ejemplo de la visualización in vivo del tejido endometrial marcado y trasplantado subcutáneamente. Se observa que al ampliar el campo, la detección del implante se optimiza. Las barras blancas equivalen a 1 cm en todos los casos.

El tejido endometrial marcado se dividió posteriormente en 9 fracciones del mismo tamaño, que se trasplantaron subcutáneamente, a razón de una fracción por animal, en 9 ratonas de la cepa B6N-Tyr^{c-Brd}/BrdCrCrI (ratonas receptoras). Tras el trasplante, los implantes de tejido endometrial pudieron ser visualizados mediante el equipo de monitorización *in vivo* Carestream *In vivo* FX-PRO (figura 1C). Para dicha visualización fue necesario depilar la zona del trasplante y emplear unas plantillas negras opacas que dejaban solo al descubierto un cuadrado de 1x1 cm² en la zona justa de implantación. De esta forma se evitó que la alta fluorescencia que presenta el pelo blanco de estos animales enmascarase la señal del implante.

5.2 Evaluación del efecto de la inhibición de PAI-1 en el tamaño de las lesiones endometriósicas

8 días después del trasplante (D8), las 9 ratonas receptoras se dividieron en dos grupos: grupo tratado (n=4) y grupo control (n=5). A las ratonas del grupo tratado se les administró el inhibidor de PAI-1 conocido como PAI-039 o tiplaxtinin. Dicho inhibidor se administró oralmente a una dosis de 300 µg/día hasta el día del sacrificio (D21). A las ratonas del grupo control se les administró DMSO (vehículo de

PAI-039) a una dosis idéntica a la suministrada a las ratonas del grupo tratado al administrarles el PAI-039. Pese a la toxicidad del DMSO, la cantidad administrada del mismo se encontraba por debajo del umbral de toxicidad de dicho compuesto en administraciones prolongadas.

Como se puede observar en la figura 2, tanto en las ratonas del grupo tratado como en las ratonas del grupo control se registró una disminución de la señal fluorescente a lo largo del tiempo, tal y como se esperaba atendiendo a lo reportado en la bibliografía (Wang y cols, 2014) debido a la expresión episomal de los adenovirus empleados para el marcaje celular. No obstante, al comparar el registro de fluorescencia entre las ratonas de ambos grupos, se observó que en las ratonas del grupo tratado (*Figura 5.2A*), a diferencia de en las ratonas del grupo control (*figura 5.2B*), se daba una disminución pronunciada de la señal fluorescente entre D8 (día de inicio del tratamiento) y D11 (primer día de monitorización *in vivo* tras el inicio del tratamiento).

Al aproximar el tamaño de las lesiones al volumen de una figura de base igual al área de la señal fluorescente y de altura igual a la intensidad media de la misma, se observó que tras tres días de tratamiento el tamaño de las lesiones de las ratonas del grupo tratado se había reducido al 38%, reducción efectivamente muy superior a la observada en las ratonas del grupo control (81%) (*Figura 5.3*).

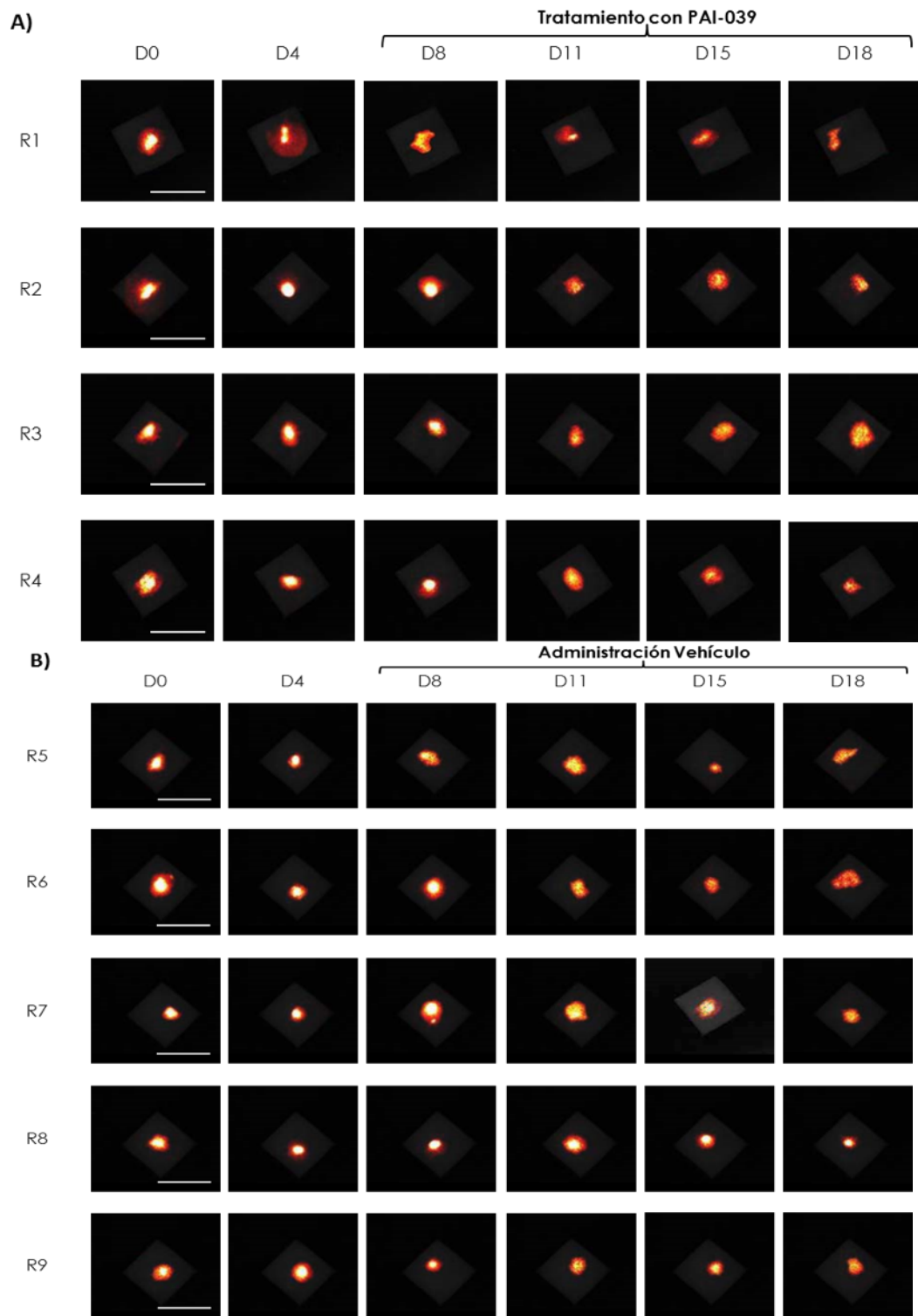


FIGURA 5.2 Monitorización in vivo de las lesiones endometriósicas mediante el equipo Carestream In Vivo FX-PRO. A) Grupo tratado con PAI-039 B) Grupo control (administración vehículo). La barra blanca equivale a 1 cm.

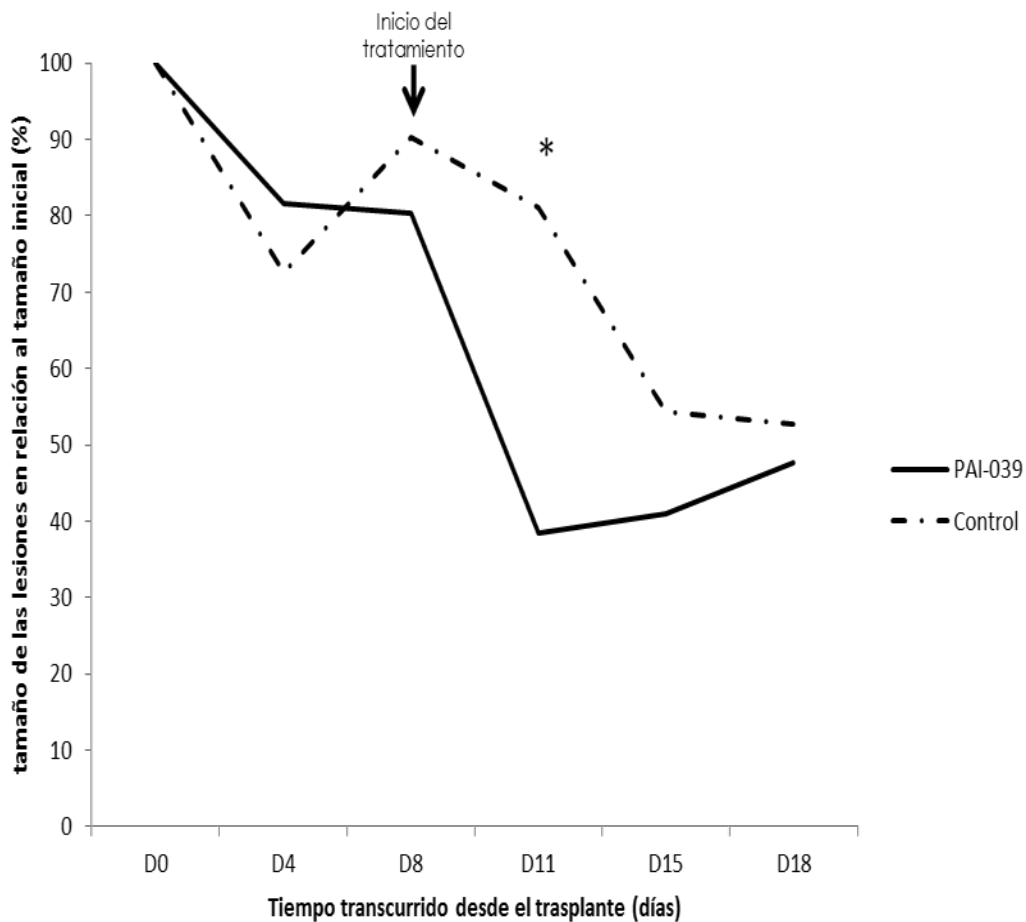
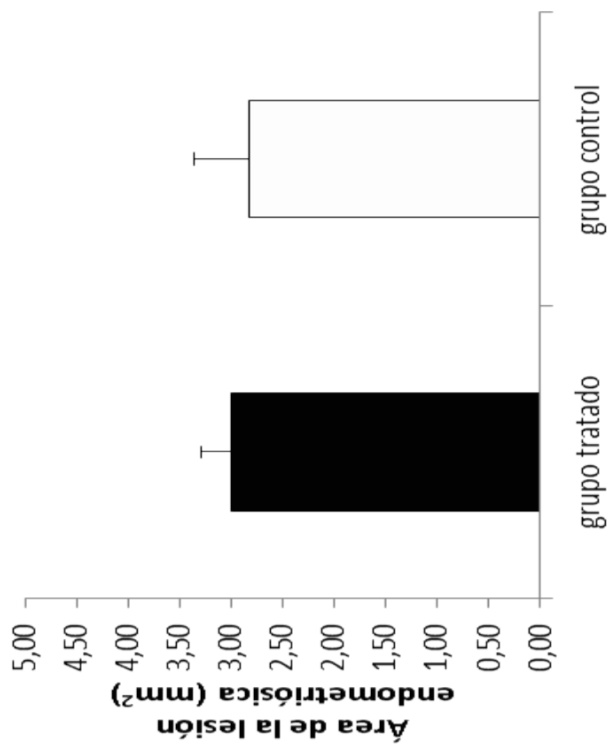


FIGURA 5.3 Reducción del tamaño de las lesiones endometriósicas con el tiempo transcurrido desde el trasplante. El tamaño de las lesiones se aproximó como el producto entre el área de la señal fluorescente detectada in vivo y la intensidad de dicha señal fluorescente. Se representa el tamaño de las lesiones en función del tamaño inicial de las mismas (en %). La administración del PAI-039 o del vehículo se inició en D8. * $p < 0.05$

Pese a esta reducción en el tamaño de las lesiones endometriósicas tras la administración del tratamiento, no se detectó en las ratonas del grupo tratado extinción total de la señal fluorescente (es decir, no se detectó la pérdida total del implante) (*Figuras 5.2A y 5.2B*). Este hecho sugiere que el tratamiento con PAI-039 reduce significativamente el tamaño de las lesiones endometriósicas pero a la dosis testada no es capaz de eliminarlas por completo durante un período tan corto como dos semanas. De hecho, tras el sacrificio en D21, se observó lesión endometriósica tanto en las ratonas del grupo control como en las ratonas del grupo tratado (*Figura 5.3*), no existiendo diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de las mismas entre los dos grupos (*Figura 5.4*).

Dichas lesiones seguían emitiendo fluorescencia a D21 (*Figura 5.5.A*), fluorescencia que se debía a la expresión de mCherry por parte de las células de la lesión, tal y como se pudo comprobar posteriormente mediante una inmunohistoquímica frente a esta proteína fluorescente (*Figura 5.5.B*).

B)



A)

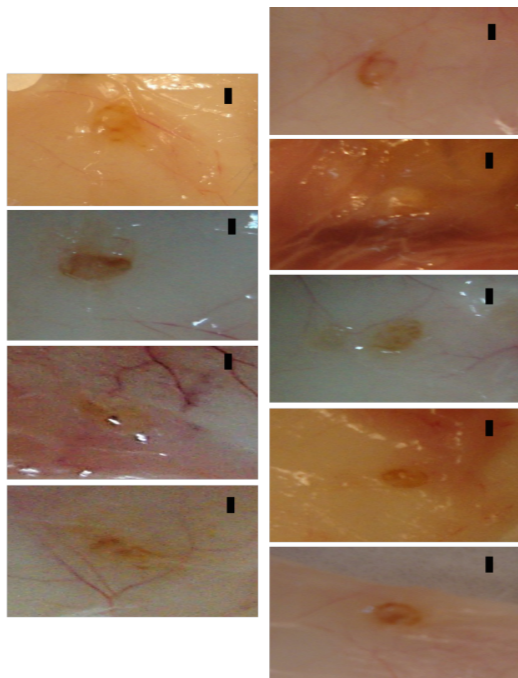


FIGURA 5.4 Tamaño de las lesiones endométriosas a D21. A) Fotografías de las lesiones observadas en las ratonas del grupo tratado (arriba) y en las ratonas del grupo control (abajo) tras el sacrificio. La barra negra equivale a 1 mm. B) Representación del área media de las lesiones de las ratonas del grupo tratado y de las del grupo control. * $p < 0.05$.

A)



B)

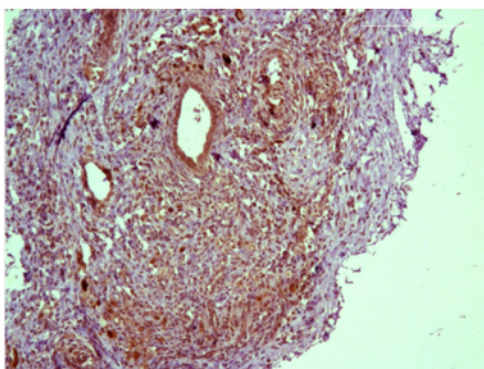
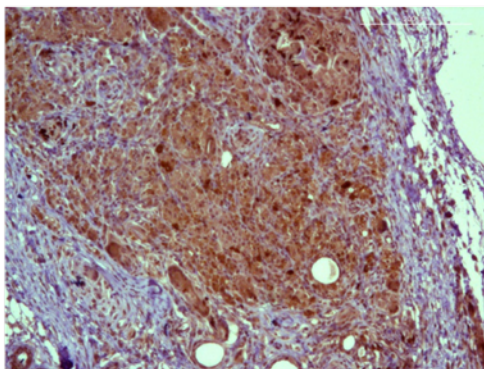


FIGURA 5.5 *Marcaje fluorescente de las lesiones a D21. A) Fluorescencia registrada en la lesión una vez extraída del animal (a D21) mediante el equipo Carestream In Vivo FX-PRO. Se observa como las células de la lesión emiten fluorescencia roja, a diferencia de las células circundantes. B) Inmunohistoquímica frente a la proteína fluorescente mCherry. Se observa que las células de la lesión expresan la proteína fluorescente mCherry.*

5.3 Caracterización de las lesiones endometriósicas

Con el fin de determinar si las lesiones observadas en las ratonas receptoras se asemejaban a lesiones endometriósicas humanas, una vez extraídas del animal se fijaron en paraformaldehído 4% y se incluyeron en parafina para realizar un estudio histológico e inmunohistoquímico de las mismas. Concretamente, se analizó la existencia de inflamación local, la presencia de depósitos de colágeno y la presencia de glándulas, todo ello característico de las lesiones endometriósicas humanas.

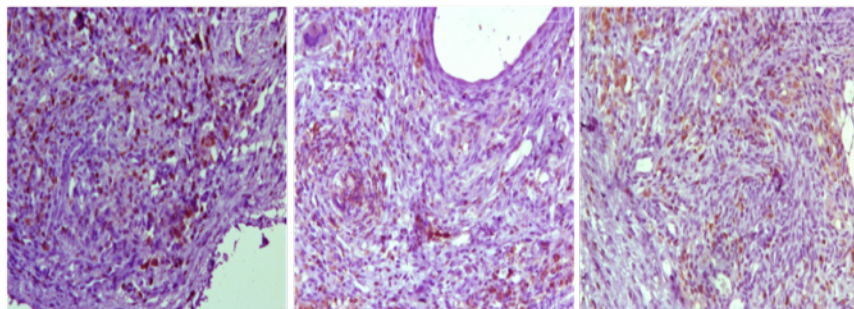
Para estudiar la existencia de inflamación local en las lesiones, analizamos la presencia de leucocitos y de macrófagos infiltrantes, realizando una inmunohistoquímica frente a marcadores específicos de cada una de estas poblaciones celulares (CD45 y F4/80, respectivamente). De esa manera, detectamos presencia de ambos tipos de infiltraciones en las lesiones de ambos grupos experimentales (*Figura 5.6A y 5.6B*).

Por otra parte, la presencia de glándulas se estudió realizando una inmunohistoquímica frente a citoqueratina, un marcador de células epiteliales. Como puede observarse en la *Figura 5.6C*, se detectaron glándulas en las lesiones de ambos grupos experimentales.

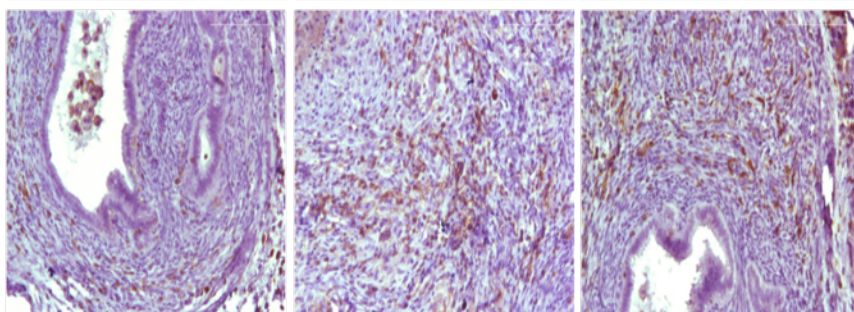
Por último, se analizó la presencia de depósitos de colágeno realizando una tinción tricrómica, tinción en la que las fibras de colágeno quedan teñidas de color azul. Tanto en las lesiones de las ratonas del grupo control como en las de las ratonas del grupo tratado detectamos depósitos de colágeno (*Figura 5.6D*).

A)

PAI-039

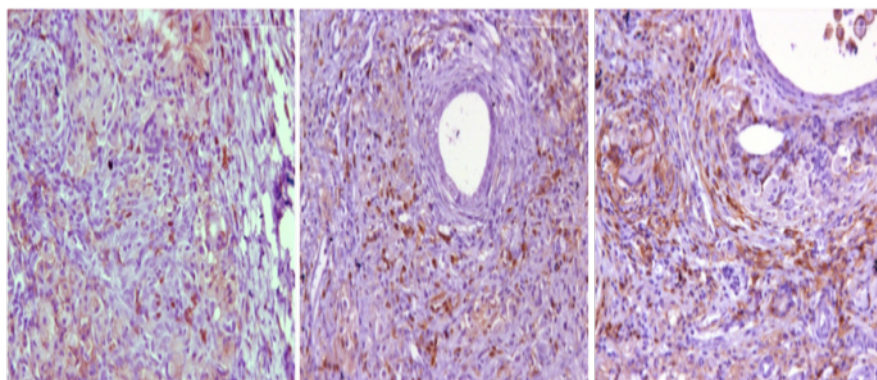


VEHÍCULO

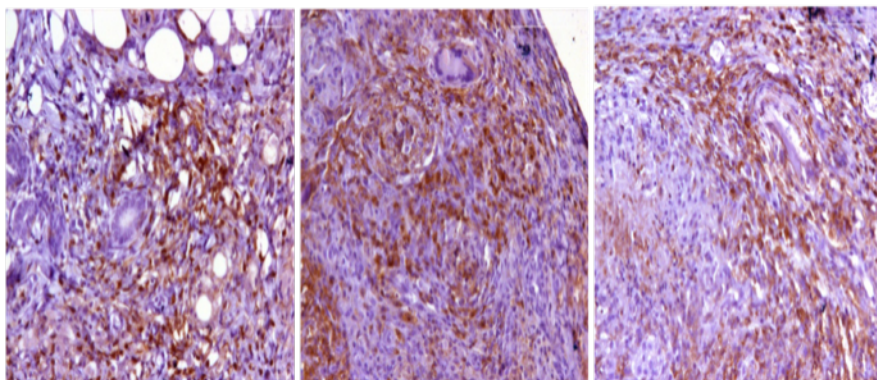


B)

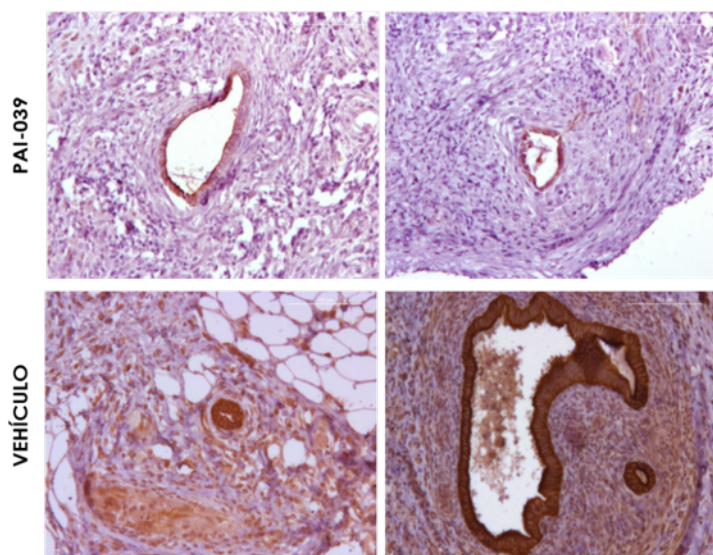
PAI-039



VEHÍCULO



c)



D)

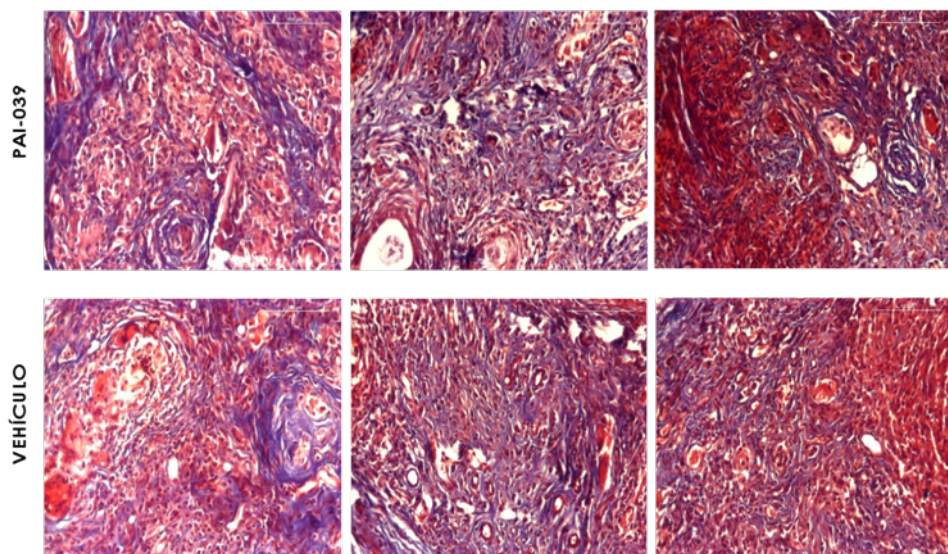


FIGURA 5.6 Caracterización de las lesiones endometriósicas. A) Inmunohistoquímica frente al marcador de leucocitos CD45 B) Inmunohistoquímica frente al marcador de macrófagos F4/80 C) Inmunohistoquímica frente al marcador de células epiteliales citoqueratina D) Tinción tricrómica (detección depósitos de colágeno).

5.4 Cuantificación fibrinólisis

A continuación, quisimos cuantificar la fibrinólisis que había existido en los implantes de ambos grupos experimentales (control y tratado) a lo largo de los 21 días de duración del procedimiento. Con dicho propósito, se realizó una inmunohistoquímica frente a fibrina, para así detectar y posteriormente cuantificar la cantidad de dicha proteína existente en las lesiones de ambos grupos (cantidad inversamente proporcional a la fibrinólisis existente: una mayor cantidad de fibrina existente en la lesión es reflejo de una menor fibrinólisis, y viceversa). Como puede observarse en la *Figura 5.7A*, se detectaron depósitos de fibrina en las lesiones de ambos grupos. No obstante, al cuantificar dichos depósitos observamos que éstos eran significativamente más abundantes en las lesiones de las ratonas del grupo control que en las lesiones de las ratonas del grupo tratado (*Figura 5.7B*).

Al determinar los niveles plasmáticos de PAI-1 activo en el momento del sacrificio (*Figura 5.8*), no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Este hecho podría venir explicado por una corta vida media del inhibidor empleado. De hecho, aunque se desconoce la vida media de esta molécula inhibidora en ratón, en rata la vida media de la misma es muy corta, aproximadamente 4h (Elokda H y cols, 2004). Puesto que no se tuvo la precaución de administrar PAI-039 durante el proceso de la última monitorización justo antes del sacrificio, es muy posible que para cuando se realizara la extracción de sangre, los niveles de PAI-039 ya

hubieron sido metabolizados y por lo tanto desaparecido significativamente de la circulación.

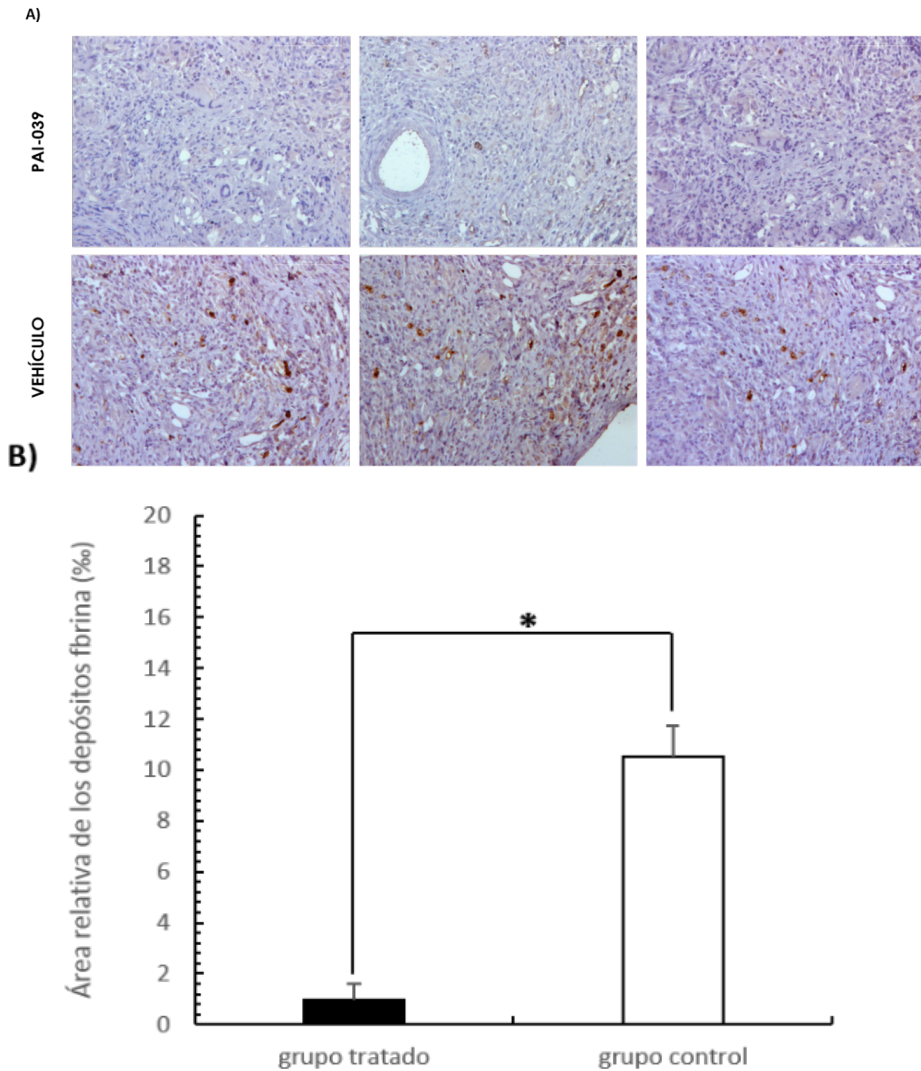


FIGURA 5.7 Fibrinolisis existente en las lesiones endometriósicas.

A) Inmunohistoquímica frente a fibrina realizada para detectar los depósitos de fibrina existentes en las lesiones. B) Resultados de la cuantificación de los depósitos de fibrina existentes en las lesiones de ambos grupos mediante el programa Image ProPlus. * $p < 0,05$

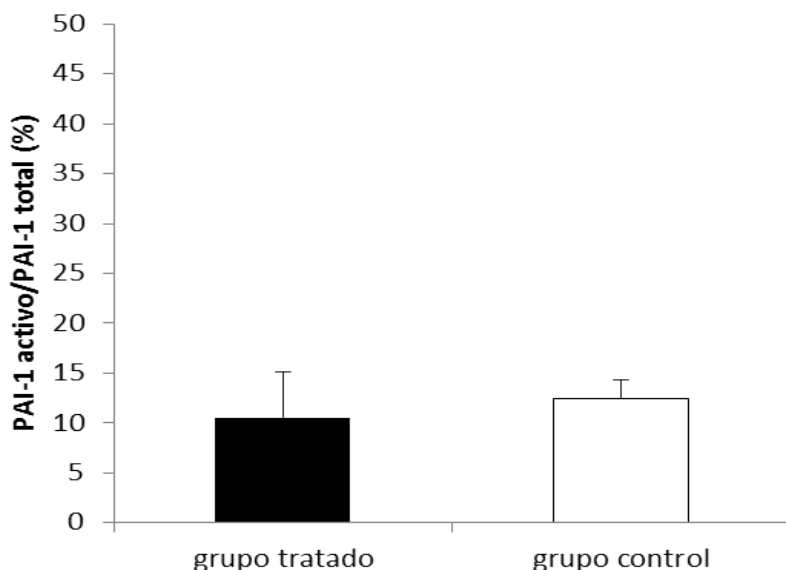
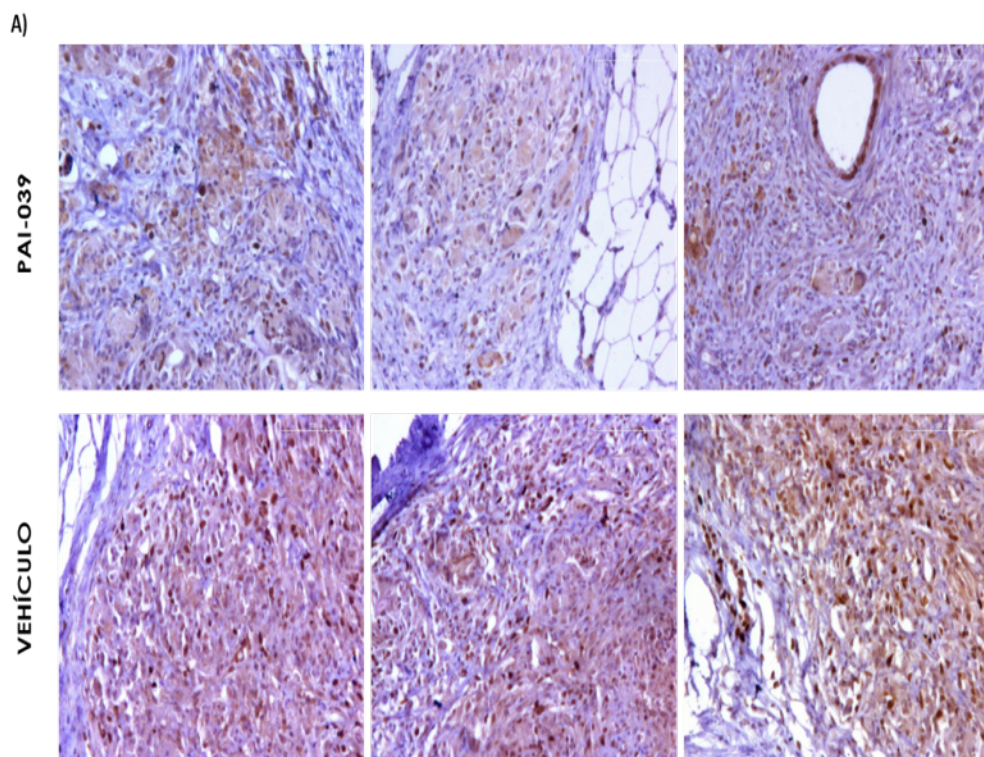


FIGURA 5.8 Niveles plasmáticos de PAI-1 activo en el momento del sacrificio (D21). Se representa la proporción de PAI-1 activo versus PAI-1 total en plasma (determinada mediante dos ensayos ELISA) en el grupo tratado y el grupo control. * $p < 0,05$.

5.5 Mecanismo responsable de la disminución del tamaño

Por último, nos propusimos determinar el o los mecanismos que podrían estar implicados en la disminución del tamaño de las lesiones endometriósicas como consecuencia de la inhibición de PAI-1. Concretamente, realizamos un estudio de proliferación, apoptosis y vascularización en las lesiones.

Para estudiar la proliferación en las lesiones, se realizó una inmunohistoquímica frente al marcador de proliferación Ki67. Como puede observarse en la *Figura 5.9A*, detectamos proliferación en las lesiones de las ratonas de ambos grupos, si bien ésta era significativamente menor en las lesiones de las ratonas del grupo tratado que en las lesiones de las ratonas del grupo control (*Figura 5.9B*).



B)

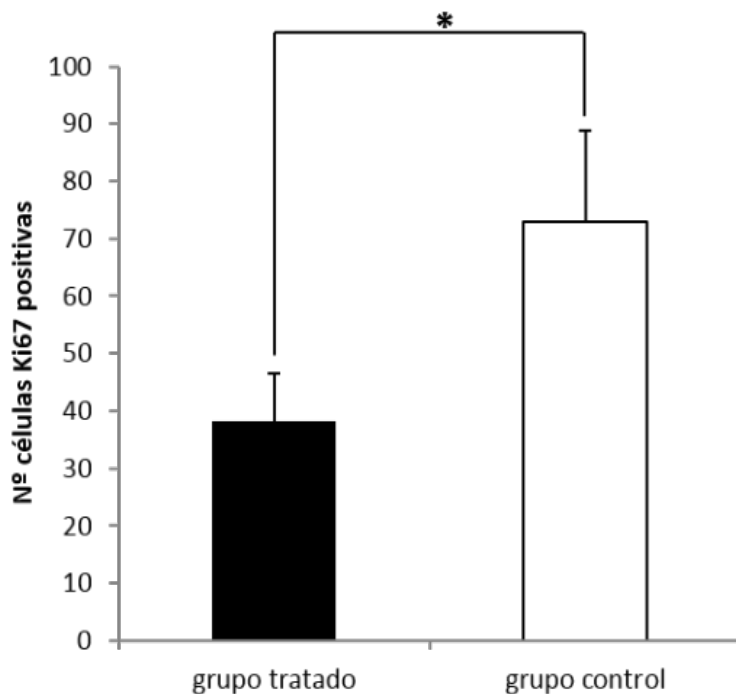
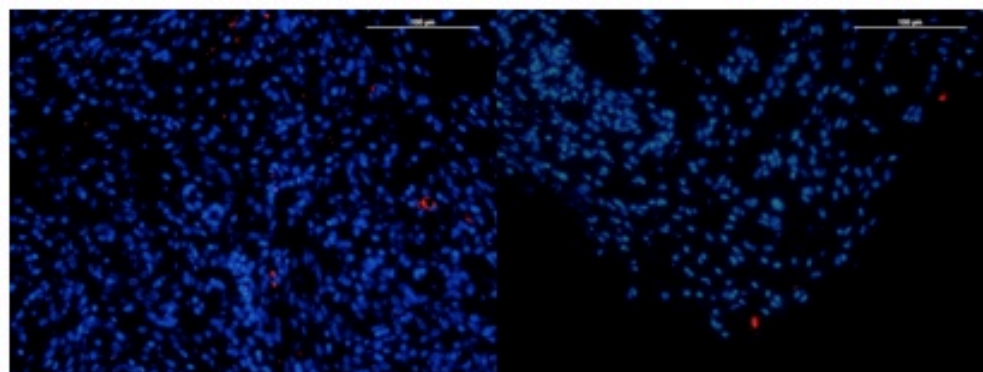


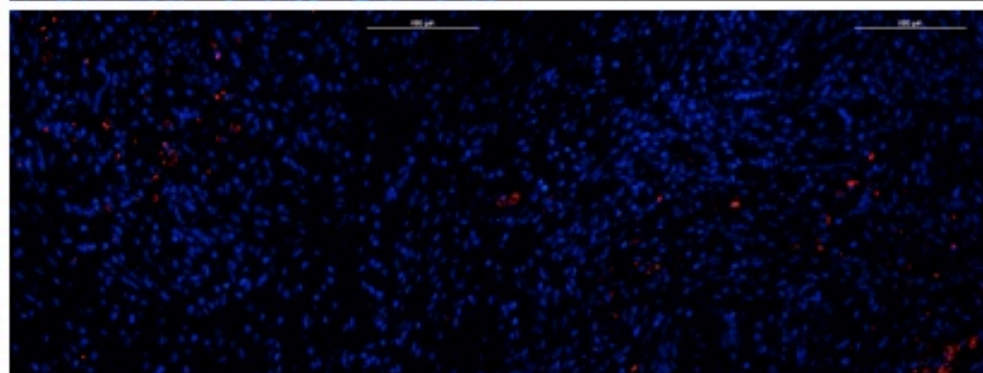
FIGURA 5.9 *Análisis de la proliferación existente en las lesiones. A) Inmunohistoquímica frente a Ki67, marcador de células en proliferación. B) Cuantificación del número de células Ki67 positivas detectadas en las lesiones de ambos grupos. * $p < 0,05$.*

El análisis de la apoptosis en las lesiones se realizó mediante la técnica TUNEL. Se detectaron muy pocas células en apoptosis tanto en las lesiones de las ratonas del grupo control como en las de las ratonas del grupo tratado (*Figura 5.10*), no existiendo diferencias entre ambos grupos.

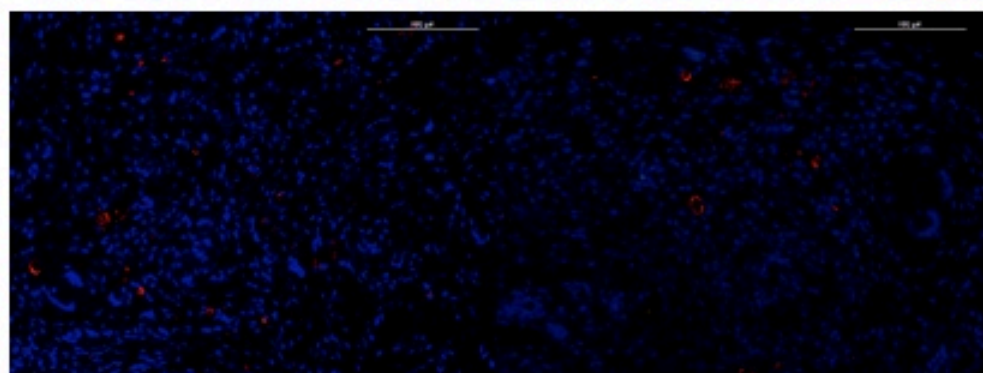
GRUPO TRATADO: R1-R3-R4



R1



R3



R4

GRUPO CONTROL

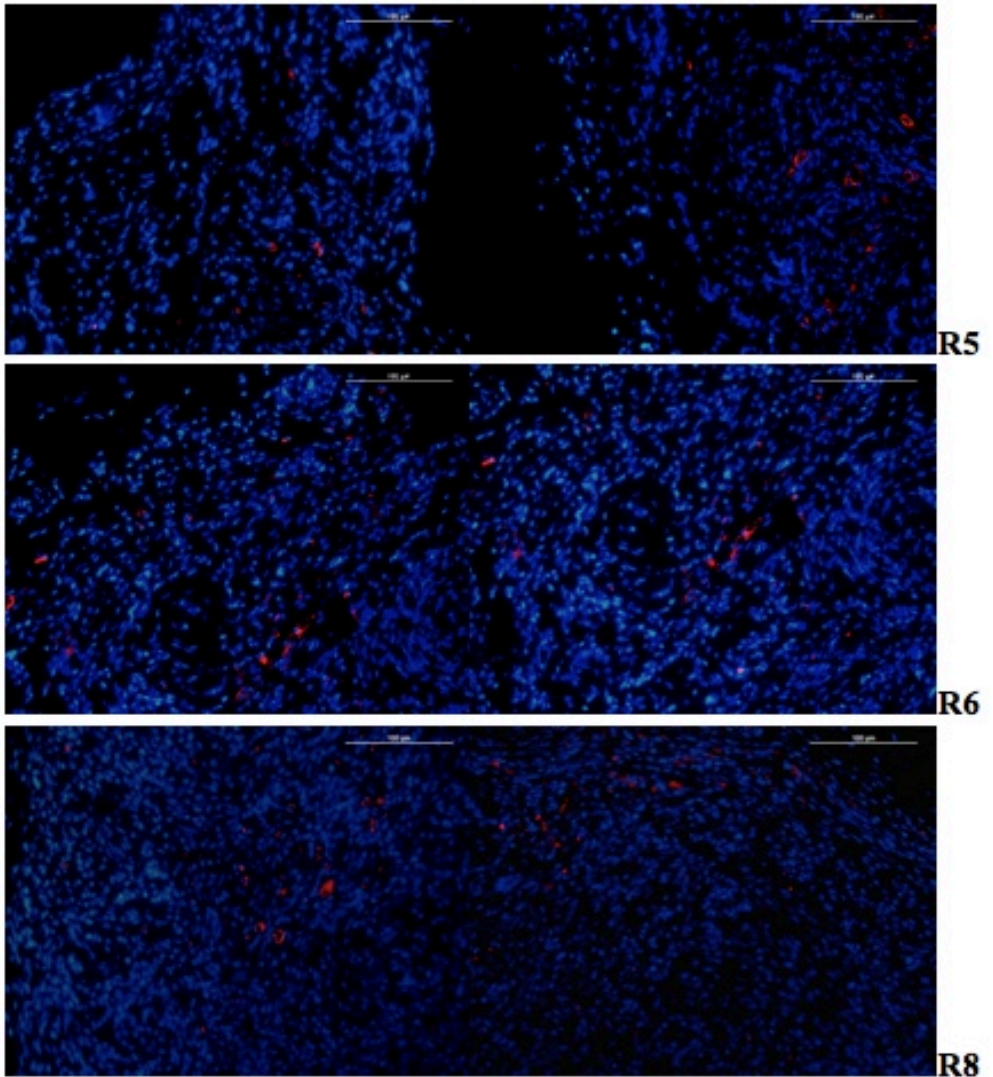
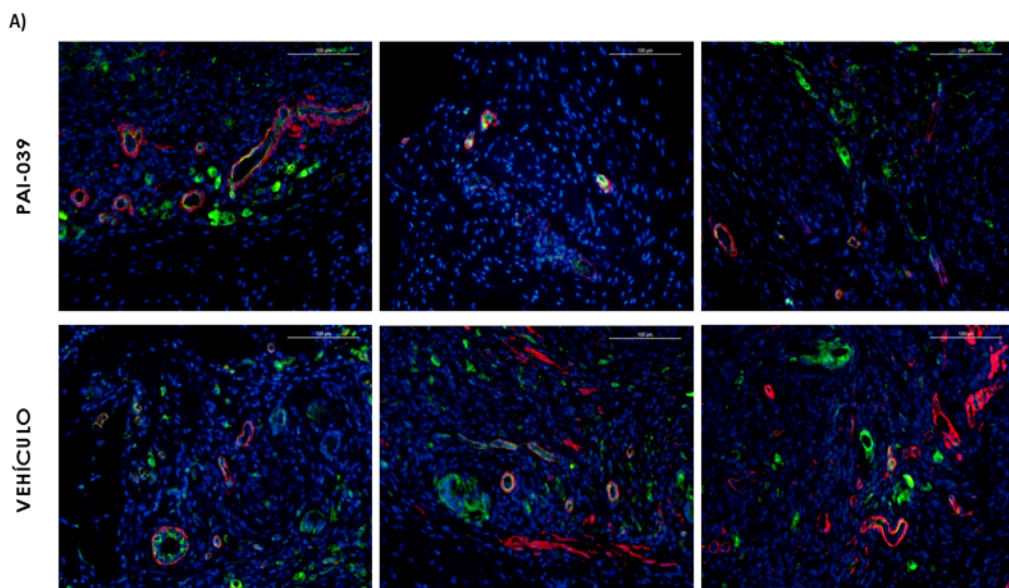


FIGURA 5.10: Análisis de la apoptosis (técnica del TUNEL). Las células apoptóticas se representan en la figura emitiendo fluorescencia rosa. Podemos observar una escasa cantidad de células apoptóticas en ambos grupos (grupo tratado: R1-R3-R4 grupo control R5-R6-R8), no existiendo diferencias entre ellos.

Por último, analizamos la vascularización de las lesiones combinando una inmunofluorescencia frente a α -sma (actina citoplasmática presente en la pared de los vasos maduros) con el uso de isolectina B4 (lectina que se une específicamente a la membrana de las células endoteliales de ratón) conjugada a fluoresceína. Como se puede observar en la *figura 5.11A*, se detectaron vasos maduros e inmaduros en las lesiones de las ratonas de ambos grupos. No obstante, en las lesiones de las ratonas del grupo tratado con PAI-039 se detectó un menor marcaje con isolectina B4 no acompañado de marcaje por α -sma (*5.11B*, *5.11C*). Este hecho refleja una menor cantidad de vasculatura inmadura en las lesiones de este grupo, si bien las diferencias observadas no resultaron estadísticamente significativas.



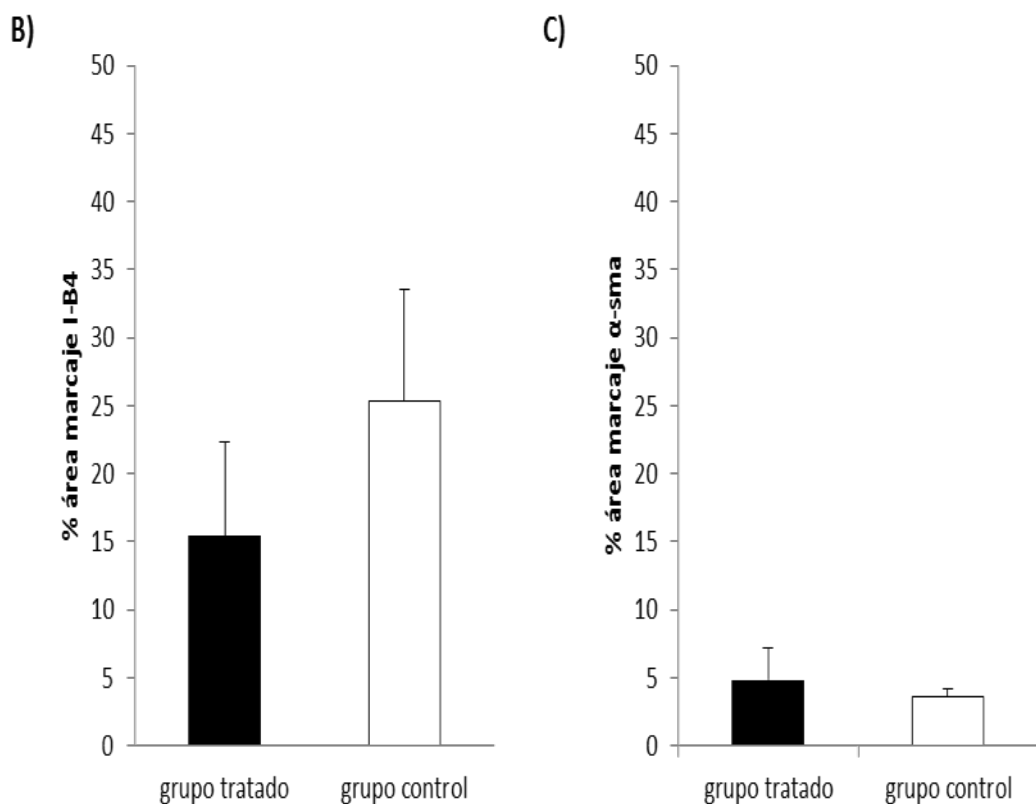


Figura 5.11 Análisis de la vascularización existente en las lesiones.

A) Inmunofluorescencia frente a α -sma (rojo) combinada con el uso de isolectina-B4 (verde). B) Cuantificación del % del área de la lesión positiva para el marcaje con isolectina-B4. C) Cuantificación del área de la lesión positiva para el marcaje con α -sma.

6.- DISCUSIÓN

La **endometriosis** es una enfermedad que genera un gran consumo de recursos sanitarios (Simoens y cols, 2007) por el hecho de tratarse de una patología crónica y que se presenta en mujeres relativamente jóvenes y en edad fértil, que van a requerir múltiples visitas al especialista y diversos tratamientos, ya sea para paliar el dolor que padecen o la esterilidad asociada a la misma (Goldstein y cols, 1980; Eskenazi y cols, 1997); de aquí radica el interés en el estudio que genera dicha enfermedad. La **cirugía** laparoscópica es el gold standard para establecer el diagnóstico de endometriosis y proporciona una oportunidad para un tratamiento quirúrgico conservador en el mismo acto; sin embargo, aunque la cirugía es a día de hoy el método más eficaz para extirpar las lesiones endometriósicas, la posibilidad de recidivas en esta enfermedad es elevada y no sería una solución aceptable el intervenir a una paciente reiteradamente. Además, las potenciales desventajas de la misma, que se multiplican con el número de cirugías realizadas sobre la misma paciente, como el daño inadvertido en órganos adyacentes (especialmente intestino y vejiga), las complicaciones infecciosas postquirúrgicas o el daño mecánico a las estructuras pélvicas que derivaría en una mayor formación de adhesiones desaconsejarían o limitarían su uso a situaciones muy determinadas. Así pues se debe procurar como alternativa a estas pacientes otros abordaje no invasivo capaz de tratar la enfermedad y disminuir las recidivas evitando los tratamientos quirúrgicos de repetición. En este sentido nos referimos a los tratamientos farmacológicos. Dentro de los **tratamientos** médicos, los más utilizados en la actualidad son los tratamientos hormonales

antiestrogénicos, administrados en base a las características hormonodependientes de la endometriosis (Speroff y Fritz, 2006). Sin embargo, ninguno de ellos se ha mostrado completamente satisfactorio (Mihalyi y cols, 2006). En cambio presentan efectos secundarios derivados de su acción hormonal, induciendo muchos de ellos una menopausia artificial durante su uso, sofocos, disminución de la densidad mineral ósea, entre otros (Surrey, 2006; Crosignani y cols, 2006; Fedele y Berlanda, 2004). Los múltiples avances en el conocimiento de la fisiología de la enfermedad realizados en los últimos años, junto a las carencias de los tratamientos actuales han volcado el interés en el estudio experimental con nuevos tratamientos no hormonales que ofrezcan nuevas opciones terapéuticas a estas pacientes. El objetivo de estos tratamientos, en su mayoría, en fase experimental, sería el tratar de disminuir el tamaño de las lesiones y a la vez controlar los síntomas de la enfermedad sin interferir en el estado hormonal de las pacientes, evitando de este modo los efectos secundarios derivados de esta supresión hormonal (Olivares y cols, 2008).

A tenor a los resultados obtenidos por el grupo del Dr Pellicer en el trabajo de Gomez y cols (Gomez y cols 2011), sobre el efecto de la quinagolida en la reducción de lesiones endometriósicas, y a otros estudios sobre la expresión del sistema fibrinolítico en condiciones patológicas de endometriosis, nos propusimos evaluar qué repercusión tendría la activación de la fibrinólisis endógena sobre la enfermedad, mediante el bloqueo de uno de sus inhibidores principales: el PAI-1.

Evidentemente para poder generar esta hipótesis de trabajo tuvimos con anterioridad que evaluar la bibliografía existente al respecto del **sistema fibrinolítico**, su funcionamiento y por ende su potencial papel en el desarrollo de la endometriosis. En este sentido la fibrinólisis es un mecanismo de control fisiológico para la destrucción de coágulos que pudieran llevar a fenómenos trombóticos. Se basa en la conversión del plasminógeno, en su enzima activa, la plasmina, capaz de degradar el coágulo de fibrina (Collen D y Lijnen HR, 1991; Lijnen HR y Collen D, 1993) (*Figura A*); Esta actividad se promueve mediante dos enzimas , el activador tisular del plasminógeno (tPA) y activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) y se inhibe principalmente mediante el **inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1)**, como se refleja en la figura resumen (*Figura 6.1*):

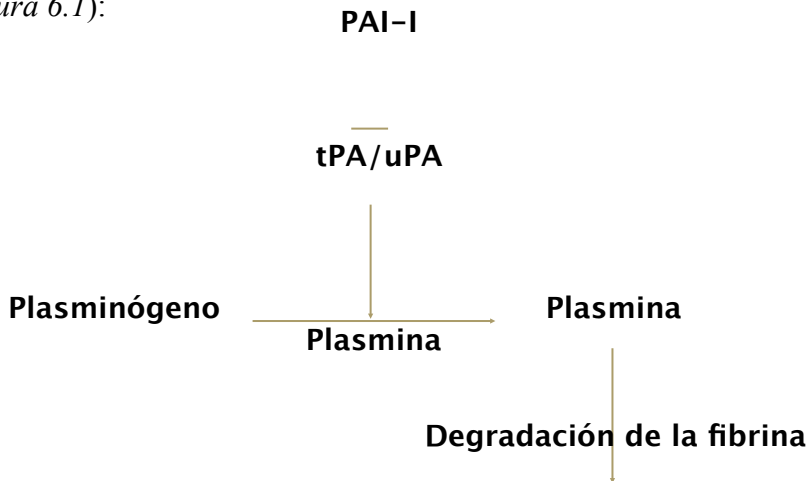


FIGURA 6.1: Esquema simplificado del papel del PAI-1 en el funcionamiento del sistema fibrinolítico

Como hemos comentado anteriormente en la introducción, y a tenor de los estudios revisados que discutiremos a continuación, postulamos que el PAI-1 tendría un comportamiento dual en el desarrollo de la endometriosis: en los estadios iniciales la fibrinólisis estaría potenciada para favorecer la implantación, y por tanto el PAI-1 se vería disminuido, mientras que en estadios más avanzados la fibrinólisis se inhibiría para mantener la estabilidad de los implantes y en consecuencia el PAI-1 estaría aumentado. En este sentido nosotros observamos en los estudio de Gomez y cols, que el gen que mayor represión sufría durante la degeneración de las lesiones ya implantadas era el de la serpina 1, que codifica para la enzima PAI-1 y de ahí nuestra hipótesis al respecto del papel favorecedor que el aumento del estado fibrinolítico tiene sobre la destrucción de lesiones.

Los estudios in-vitro muestran datos acordes a nuestras hipótesis. En este sentido se ha observado que en medios de cultivo existe una menor liberación de uPA en las células endometriósicas (Guan YM y cols, 2002) que en las de tejido eutópico y lo cual sugiere que el endometrio ectópico promueve una inhibición de la fibrinólisis para favorecer el crecimiento. En la misma línea encontramos los estudios de Gleeson y cols y Sillem y cols en los que estos autores detectaron un aumento de la expresión de PAI-1 en presencia de progesterona (Gleeson N y cols, 1993; Sillem M y cols, 1997) y un aumento de la secreción de su-PAR en las células endometriales de las mujeres con endometriosis (Sillem M y cols, 1997). Esto sugiere de nuevo que las células endometriósicas parecen favorecer mecanismos de inhibición de la fibrinólisis (Sillem M y cols, 1997). Sin embargo,

un reciente estudio in vitro del grupo de Schneider abogaría por un efecto inverso del postulado, es decir, que un aumento de la fibrinólisis aumentaría la invasividad de la endometriosis en lugar de disminuirla. Schneider mostró que la inhibición de Syndecan-1, un “target” del RNA de interferencia miR-10b que se utilizó para su bloqueo, inhibía la invasividad de las células endometriósicas epiteliales a través de la regulación a la baja de la actividad metaloproteasa y de la Interleuquina 6, y la regulación a la alza de la expresión del PAI-1 (Schneider y cols, 2013). Asumiendo que los incrementos de PAI-1 inhiben la fibrinólisis, cabría pues deducir que la inhibición de esta impediría el desarrollo de la enfermedad según el estudio in-vitro de Schneider.

Los estudios observacionales igualmente arrojan datos de todo tipo, desde lo que presuntamente avalarían nuestro razonamiento, hasta los que contradicen nuestra hipótesis pasando por estudios que muestran datos paradójicos. En este sentido, in-vivo se han observado un aumento de los niveles antigénicos de uPA pero también de PAI-1 en extractos citosólicos de tejido endometriósico (Bruse C y cols, 1998). En concreto mediante técnicas de cuantificación proteica, como el ELISA, se ha evidenciado una mayor concentración de uPA y PAI-1 en endometrio de mujeres con endometriosis que en el endometrio de controles. Estos niveles serían todavía mayores al estudiar muestras de tejido endometriósico (Bruse C y cols, 1998). A su vez técnicas de inmunohistoquímica han confirmado que la mayor expresión de uPA, en el endometrio de las pacientes con endometriosis, está localizada en el epitelio glandular. Con la

hibridación in situ se ha detectado una expresión focal del mRNA de PAI-1 en el estroma, el epitelio glandular y el endotelio de los vasos del endometrioma ovárico (Gilabert-Estellés y cols, 2003). Esto supondría que por un lado se favorece la fibrinólisis con el aumento de uPA pero simultáneamente se inhibe con los aumentos de su inhibidor en las lesiones.

En el trabajo de Gilabert Estellés mencionado, el endometrio de las mujeres con endometriosis no mostró aumento en los niveles antigénicos de PAI-1 en comparación con los controles (Gilabert-Estellés J y cols, 2003) . Estos resultados fueron concordantes con estudios previos (Fernandez-Shaw S y cols, 1995), donde no se encontraron diferencias en la expresión de PAI-1 mediante técnicas de inmunohistoquímica entre el endometrio de mujeres con y sin endometriosis. Si bien la incapacidad para detectar estos cambios por inmunohistoquímica puede deberse, bien a una baja sensibilidad de los anticuerpos utilizados, o la incapacidad de la inmuno para poder realizar una cuantificación precisa de los niveles proteicos reales en el tejido, no hemos de olvidar que las observaciones se realizaron no en endometrio ectópico sino en el eutópico, por lo que no serían estrictamente desacordes a nuestra hipótesis. Además, hay que remarcar sin embargo que en el mismo estudio de Gilabert sí se detectó un nivel elevado de PAI-1 en los endometriomas ováricos, lo que apoyaría nuestra hipótesis al respecto, sugiriendo una mayor expresión de inhibidores como PAI-1 y TIMP-1 y una baja actividad proteolítica en estadios más avanzados de la enfermedad.

Tomados de forma global lo que posiblemente estén reflejando los estudios es que quizás, y con ello especulamos, el tejido endometriósico no promueve una inhibición total de la fibrinólisis una vez establecido sino que más bien trata de regularla manteniendo un equilibrio entre la destrucción y creación de nueva matriz de modo que el estímulo fibrinolítico sea lo suficientemente intenso como para promover la diseminación e invasión del tejido patológico pero a la vez no tan intenso como para promover su propia autodestrucción. Esto quizás explicaría los aumentos simultáneos tanto de factores profibrinolíticos como de sus correspondientes inhibidores. Llegados a este punto lo que nos planteamos es cual podría ser el efecto de desplazar el equilibrio fibrinolítico hacia uno u otro lado. Especulamos que la inhibición total de la fibrinólisis resultaría a lo máximo en un mantenimiento de las lesiones existentes lo cual no supondría ninguna ventaja frente a los tratamientos hormonales existentes que se “limitan” a ejercer un efecto de inhibición del crecimiento de lesiones sin afectar a su tamaño. En contra, especulamos que promover la fibrinólisis resultaría en un efecto mucho más radical bien favoreciendo la mayor diseminación del tejido o bien como mantenía nuestra hipótesis en la destrucción del tejido patológico.

Para evaluar esta posibilidad optamos por utilizar un **modelo animal** con un sistema inmune íntegro. Dado el papel primordial que juega éste en el desarrollo de la endometriosis (Giudice 2010) y que desconocemos como el PAI-1 puede alterar el sistema inmune y con ello sus efectos sobre la endometriosis, quisimos preservarlo en

nuestro modelo, ofreciendo así un ambiente de estudio más fisiológico con el que poder trasladar con mayor fiabilidad los resultados obtenidos en el estudio hacia su posible aplicación en humanos. Del mismo modo quisimos que nuestro modelo se asemejara en la medida de lo posible al humano en cuanto a la fisiología del tejido implantado. Para ello utilizamos un modelo murino homólogo de endometriosis desarrollado por el grupo de Charnock-Jones en el que las características fisiológicas del tejido “menstruante” humano pueden mimetizarse mediante la generación de tejido pseudodecidual murino. (Cheng y cols 2011). Así mismo quisimos que los efectos sobre el tejido pudieran monitorizarse a tiempo real y de manera no invasiva. Con ello perseguimos por un lado detectar posibles sesgos en la respuesta debidos por ejemplo a la no implantación del tejido ectópico o su falta de viabilidad inicial que pudieran confundir el efecto real de la respuesta ejercida por los medicamentos . Así mismo quisimos que fuera no invasivo de manera que la respuesta no estuviera sujeta a sesgos de manipulación como por ejemplo los necesarios para observar el crecimiento del tejido. En este sentido nos propusimos utilizar un modelo de monitorización de las lesiones a partir de su previo marcaje mediante fluorescencia de manera similar al desarrollado por Fortin et al (2006) con algunas modificaciones como por ejemplo el tipo de proteína fluorescente empleada para marcaje, en nuestro caso m-cherry mucho más potente que el GFP usado en estudios previos (Fortin y cols 2006) . Además el uso de este modelo tiene la particularidad de que permite la estimación del tamaño de las lesiones de un modo mucho más sensible, controlado y

objetivo que los usados convencionalmente basados en la medición directa del implante mediante calipers y que está sujeto a una gran variabilidad debido a lo grosero de dichas mediciones. En este sentido no es difícil intuir que es harto complicado delimitar específicamente el tamaño individual de las lesiones una vez incluidas en el tejido hospedador. Así mismo aún en el caso de que se pudiera delimitar fehacientemente los límites del tejido huésped/hospedador y pudiera ser extirpado milimétricamente; aún con esto el margen de error de las mediciones con los calipers se estima en varios mm. Puesto que las lesiones a implantar raramente sobrepasan los 5-10 mm³ de volumen no es difícil prever que el más mínimo error de 1-2 mm³ en la medición con los calipers pudiera enmascarar los efectos reales o la ausencia de estos que las drogas a ensayo pudieran tener en el modelo. Por el contrario desde el momento en que el tamaño de la lesión pasa a depender de la estimación de la intensidad de la fluorescencia, y esta puede medirse objetivamente en el rango de lo, por así llamarlo, microscópico, las posibles variaciones debidas a la toma de medidas se minimizan evitándose con ello que las diferencias inherentes al tratamiento queden enmascaradas.

Una vez detalladas la bondades del modelo de monitorización a emplear, nos planteamos cual sería la mejor estrategia para promover la fibrinólisis. En ese sentido decidimos actuar a nivel del PAI-1 mediante su inhibición con el **PAI-039**; siendo éste uno de los compuestos comerciales inhibidores del PAI más potentes y mejor estudiados en modelo in vivo hasta la fecha. Ofrece además de una excelente biodisponibilidad oral, una amplia seguridad toxicológica,

buena farmacocinética y facilidad para sintetizarlo en grandes cantidades, razones de peso que nos llevaron a seleccionarlo entre otros compuestos.

Para poder determinar la tasa de cambio en el **tamaño de las lesiones**, iniciamos nuestra experimentación determinando los niveles de intensidad de fluorescencia de partida, eso es justo tras el momento en que las lesiones habían sido implantadas y antes de iniciar los tratamientos. Observamos que durante las posteriores mediciones que se sucedieron pudimos determinar tempranamente que incluso en los animales que no recibían más tratamiento que el puro vehículo (placebo) la señal iba extinguiéndose paulatinamente con el tiempo. Este comportamiento era congruente con estudios previos en modelos animales similares a este (Fortin y cols 2006, Garcia-Pascual y cols, 2015 y se debe a la expresión episomal de los adenovirus conteniendo la proteína fluorescente (Wang X y cols 2000). De hecho al no integrarse en el genoma del huésped la expresión dentro del plásmido se va diluyendo y silenciando a lo largo del tiempo (Nelson JE y cols, 1997). Sin embargo, y aún con esto, detectamos en el experimento que esta disminución de la señal era mucho más rápida en el grupo de ratonas tratadas con PAI-039 que en el grupo control y podía observarse claramente en día 11, apenas tres días después del inicio (día 8) del tratamiento con el inhibidor. Hay que especificar que el tratamiento se administró en este día para poder simular más fielmente el estado de las pacientes con endometriosis que nos encontramos en la clínica, esto es, con lesiones ya establecidas claramente. De haber administrado el compuesto al inicio, con la lesión todavía

estableciéndose, no hubiéramos respetado en buena lógica la situación potencial que viven las pacientes con endometriosis en las que las lesiones ya están claramente implantadas. Si bien desconocemos con exactitud el momento justo en que las lesiones quedan, por así decirlo, "establecidas" en el modelo animal, estudios previos de Donnez y cols (Donnez J y cols, 1998) muestran que en los modelos heterólogos se produce una revascularización total del tejido implantado por parte de la vasculatura del hospedador en torno a 5 días tras su implantación . Así pues consideramos que este era un periodo prudencial para que el tejido se asentara y se revascularizara si así era necesario, reflejando el carácter de lesión "estable" que hemos mencionado. En el día 11 se observó que tras tres días de tratamiento la señal luminosa que desprendían las lesiones cayó a un 38% en el grupo tratado mientras que en el grupo control tan sólo cayó hasta un 81% (*Figura 5.3 de RESULTADOS*). Con el paso de los días, la señal en el grupo placebo siguió bajando paulatinamente en concordancia con la expresión transiente y episomal de la proteína fluorescente que se va perdiendo con el tiempo. Para el día 21 la intensidad de la señal en el grupo control era un 50% inferior a la inicial, datos que se ajustan perfectamente a lo esperable para este tipo de modelo atendiendo a nuestra propia experiencia (Garcia-Pascual y cols, 2015) y al de otros (Wang y cols, 2000). En el caso del grupo tratado sin embargo, observamos un fenómeno peculiar que inicialmente no pudimos explicar ya que la fluorescencia a partir del día 11 no sólo no bajaba, sino que se mantenía e incluso aumentaba con el tiempo, fenómeno totalmente ilógico a la luz de la bibliografía existente. Temiendo el

desarrollo de algún tipo de artefacto procedimos a comprobar en el día del sacrificio que las lesiones realmente seguían en su ubicación original y que la fluorescencia emitida correspondía a éstas. Una vez tuvimos acceso al bolsillo subcutáneo pudimos observar que las lesiones seguían en su ubicación original. Como mecanismos de control quisimos determinar si todavía seguían emitiendo fluorescencia y procedimos a monitorizarla en las lesiones ya libres de tejido peritoneal que las ocultara, observando la persistencia de la misma en las mencionadas condiciones. Estos resultados venían a sugerir varias consideraciones. En primer lugar, que la lesión todavía seguía estando viva y viable. En segundo que, pese a la rápida reducción inicial de las lesiones endometriósicas, la no extinción total de la señal fluorescente y, evidentemente, el hallazgo de la misma, indicaba que la lesión no se había reabsorbido o reducido totalmente. En tercero que, muy probablemente, desde la pérdida de señal a partir de cierto valor, rondando el 60-70% , se pierde así mismo la linealidad en las mediciones. Esto es muy posiblemente que, o bien el umbral de detección se alcanza, o bien la máquina carece de la sensibilidad suficiente para detectar pérdidas de intensidad cuando ésta es muy pequeña. En otras palabras, muy posiblemente, los pequeños incrementos de fluorescencia en el grupo tratado a partir del día 15 lo que realmente estén reflejando son variaciones aleatorias en torno al límite de detección de la máquina. Puesto que la intensidad de la señal una vez libre del tejido peritoneal (momento del sacrificio) es superior a la que le ofrece la lesión en el interior del cuerpo, parece muy probable que el tejido del hospedador interfiera (absorba) de algún

modo (como por ejemplo mediante autofluorescencia debida a las clorofilas del alimento, etc...) con el flujo total y real de energía emitida por la lesión. Con ello lo que especulamos es que muy posiblemente a partir del día 15 la intensidad de la señal siguió reduciéndose en el grupo tratado pero que la sensibilidad del aparato o del modelo no fue suficiente para detectarla. Alternativamente es posible que no fuera así y que la señal se estabilizara en el grupo tratado toda transcurrido el intenso y brusco periodo inicial de descenso. De ser así las características del modelo animal y aparato empleado no permiten determinarlo lo cual sugiere que los estudios con este tipo de modelo deberían circunscribirse a estudios de corta duración en los que se espere una respuesta muy rápida y contundente de los compuestos a ensayo. Sea como fuere, las limitaciones de este modelo si permitieron establecer diferencias entre los grupos tratados muy claras entre los días de estudio 8-18 en que esas fueron significativamente diferentes entre el grupo tratado y el control, lo cual sugiere un claro efecto de la inhibición del PAI-1 sobre el tamaño de las lesiones. Evidentemente los inconvenientes inherentes a este modelo se podrían haber solventado realizando un estudio a largo plazo con animales ya marcados con expresión constitutiva de proteínas fluorescentes que permitieran realizar un marcaje continuo. Sin embargo ese tipo de estudios implica de entrada un alto coste económico en términos de adquisición, propagación y mantenimiento de colonias transgénicas, así como los inherentes a una monitorización más larga en términos de uso de aparatajes y servicios quirúrgicos auxiliares (anestesias, cirugías) y uso de fungible y compuestos a

ensayo. Evidentemente quisimos testar de inicio nuestra hipótesis en un modelo animal más sencillo. A la vista de estos resultados tan prometedores en el modelo de ratón heterólogo, estaríamos en condiciones de dar el siguiente paso ensayando el empleo de PAI-1 en un modelo homólogo que nos permitiera complementar la información obtenida con estudios a largo plazo con los que en conjunto poder trasladar más fidedignamente las implicaciones de los hallazgos al futuro terapéutico uso clínico.

Dado que estábamos empleando un nuevo modelo adaptado de los existentes, pero novedoso e inexplorado al fin y al cabo, quisimos determinar hasta que punto las lesiones murinas podrían reflejar la fisiología de las lesiones humanas. Para ello realizamos obviamente una primera **caracterización histológica de las lesiones** tratando de evaluar de visu las similitudes morfológicas con las lesiones humanas. Así mismo quisimos evaluar mediante inmunohistoquímica la existencia de inflamación local, la presencia de depósitos de colágeno y la presencia de glándulas, que es característico de las lesiones endometriósicas humanas. En clara concordancia con la presencia de **colágeno** en lesiones humanas pudimos detectar considerables depósitos del mismo tanto en las lesiones de animales tratados como en los controles. Teniendo en cuenta que la inhibición de PAI-1 debía afectar a los acúmulos de fibrina específicamente, no nos extrañó que los niveles de colágeno no mostraran diferencias entre ambos grupos. Parece pues, como cabría esperar, que los niveles de colágeno no se ven afectados con la afectación de la actividad de PAI-1. Así mismo, también se detectó la presencia de **glándulas** en el tejido

endometriósico de ratonas mediante inmunohistoquímica. Estas glándulas eran positivas en citokeratinas en clara referencia a las lesiones humanas (Cheng y cols,2011). En este caso tampoco detectamos diferencias en la expresión de este marcador entre grupos. Así pues, a tenor de estos resultados, comprobamos por una parte que se había reproducido de manera fidedigna la lesión endometriósica humana en un modelo de ratona y por otra que no parecía que la inhibición del PAI-1 influyera en la formación de fibras de colágeno y glándulas.

La existencia de inflamación local en las lesiones, se analizó mediante la presencia de **leucocitos** y de **macrófagos** infiltrantes, realizando una inmunohistoquímica frente a marcadores específicos de cada una de estas poblaciones celulares como son CD45 y F4/80, respectivamente, detectándose presencia de ambos tipos de infiltraciones en las lesiones de ambos grupos experimentales (*Figura 5.6A y 5.6B de RESULTADOS*). Como habíamos hipotetizado en la introducción en el estudio de Gomez y cols (Gomez y cols, 2011) los macrófagos serían responsables de la activación del proceso de fibrinólisis. En concordancia con esta hipótesis cabría esperar un aumento de macrófagos en las lesiones con mayor actividad fibrinolítica, es decir las del grupo tratado con PAI-039. Sin embargo, en contra de lo que esperábamos, no se hallaron diferencias entre los grupos en cuanto a número de macrófagos. Especulamos que quizás más que un cambio en el número de macrófagos quizás la inducción de fibrinólisis se vea favorecida por un cambio en la actividad de los mismos promovida por el “switch” entre los fenotipos M1 y M2. En

este sentido el fenotipo M2 sería el regenerativo y el M1 el destructor/inflamatorio. En el diseño original de este estudio desafortunadamente no contemplamos dicha posibilidad de origen por lo que sólo nos queda especular que posiblemente pueda haberse producido esa transición atendiendo a los estudios realizados por Capobianco (Capobianco y cols, 2011; Bacci y cols, 2009) a favor del grupo tratado.

Evidentemente antes de poder si quiera especular con la hipótesis arriba planteada era perentorio **evaluar** si existía indicio de que dicha **fibrinólisis** en efecto había tenido lugar. Para evaluar dicho parámetro realizamos una inmunohistoquímica frente a la fibrina, y así cuantificar la cantidad de esta proteína en las lesiones. Como ha quedado demostrado en el experimento, el grupo control presentó una mayor cantidad de **depósitos de fibrina** en las lesiones estudiadas estadísticamente significativa respecto del grupo tratado, lo que demuestra la mayor actividad fibrinolítica en el segundo grupo asociado a la inhibición del PAI. De manera paradójica, , esta menor activación del PAI en el grupo tratado no se pudo demostrar al determinar los **niveles plasmáticos de PAI-1 activo** en el momento del sacrificio. Si bien podría pensarse que esto está en desacuerdo con los niveles inalterados del PAI circulante, ha de tenerse en cuenta la baja vida media del PAI-039 en sangre, siendo de unas 4 horas aproximadamente en la rata y pudiendo ser muy similar en ratón. Muy probablemente la razón por la que no detectamos una diferencia en los niveles de PAI circulante fue porque desafortunadamente

cometimos un error de diseño experimental y no tuvimos la precaución de asegurar que pasaran menos de 4 horas entre la última administración de PAI-039 y su última monitorización seguida de la toma de muestra que antecede al sacrificio. Así pues muy probablemente y cuando se realizó la extracción de sangre, los niveles de PAI-039 ya habían sido metabolizados y, por lo tanto, desaparecido significativamente de la circulación. El hecho de que el PAI-039 presente esta baja vida media, podría repercutir en un posterior uso clínico del compuesto, si en un futuro se aprobara como tratamiento experimental para la endometriosis. En este sentido parece que sería necesario una administración continua del mismo, lo cual supone una desventaja si bien, en caso de aparecer efectos tóxicos adversos, su rápida eliminación repercutiría en una mejor seguridad del compuesto. Retomaremos este tema más adelante.

Siguiendo con la línea principal de descripción de resultados que nos ocupa, como hemos mencionado, a tenor de los descensos de los depósitos de fibrina pareciera que el PAI-039 pudiera funcionar efectivamente promoviendo la fibrinólisis tisular al romper los depósitos de fibrina. De ser así cabría esperar una mayor apoptosis en las lesiones tratadas así como efectos inhibitorios sobre la proliferación celular, lo que se reflejaría en la disminución del tamaño de la lesión endometriósica. Para analizar la **proliferación celular** realizamos otra inmunohistoquímica frente al marcador de proliferación Ki67, y observamos que en concordancia con nuestra hipótesis se promovió una menor proliferación en las ratonas del grupo tratado frente al grupo control. Al aplicar la técnica del TUNEL

para analizar la **apoptosis**, sin embargo, no se hallaron diferencias entre grupos. Por estudios de Donnez y cols (Donnez y cols 1998) sabemos que en los modelos heterólogos las lesiones endometriósicas tienen unas tasas de apoptosis poco elevadas, por lo que no debería haber sido difícil detectar cambios en este parámetro si la activación de la fibrinólisis hubiera actuado del modo que hipotetizamos. Ante estos resultados no tenemos más que rendirnos a la evidencia y razonar que explicaciones alternativas a la nuestra original deben imperar. En este sentido especulamos con varias posibilidades como pudiera ser: 1) que la dosis de PAI-039 no fue lo suficientemente elevada o bien que el periodo de actuación fue demasiado corto como para observar un fenómeno más drástico 2) en línea con la anterior, que los procesos iniciales de fibrinólisis no cursen con apoptosis en los tejidos 3) que la fibrinólisis no curse con apoptosis sino con inducción de necrosis directamente o bien 4) que los fenómenos apoptóticos/necróticos se produjeran en los primeros estadios del tratamiento y el tejido afectado ya hubiera sido necrosado o reabsorbido en el momento del sacrificio. Esa última hipótesis, de confirmarse, explicaría la escasa celularidad detectada en las lesiones recolectadas. Sea como fuere parece que si bien la inhibición del PAI-1 cursa con descenso del tamaño de la lesión, debemos reevaluar nuestras hipótesis iniciales en cuanto a la magnitud de la fibrinólisis inducida y sobre todo al mecanismo de acción que media estos descensos.

Al analizar el **área vascularizada** total observamos un pequeño descenso ostensible aunque no drásticamente significativo.

Así mismo observamos como el área ocupada por vasos maduros era similar en ambos grupos. De estos datos se deduce que posiblemente el PAI-1 sea capaz de inhibir la neoformación de vasos de manera moderada sin afectar a los vasos ya maduros o estables. Este cuadro es consistente con el papel clásico que tiene los inhibidores de la angiogénesis, esto es, son capaces de inhibir los vasos en neoformación que son más sensibles al estímulo angi/antiangiogénico pero no aquellos maduros que no son sensibles a estas acciones. Desconocemos a la vista de los resultados si este pequeño *descenso de la vascularización inmadura* se debe a la inducción de la fibrinólisis como hipotetizamos o simple y llanamente es un proceso independiente tal y como sugieren diversos autores que han adscrito al PAI-1 un papel regulador en la angiogénesis per se (Gomes-Giacoa y cols, 2013, Leilk y cols, 2006). En este sentido, cabe recordar los estudios de Gomez y cols (Gomez y cols, 2011) que motivaron esta tesis en donde el uso de quinagolida, que cursó con la reducción del tamaño de la lesiones en humanos, tampoco cursó con descenso de la vascularización significativa. Desconocemos si la desaparición de la lesión que ocurre en respuesta a los efectos antiangiogénicos se produce de un modo centrípeto radial (desde el exterior hasta el interior) o si simplemente los descensos en la vascularización no influyen significativamente en la reducción del tamaño de las lesiones.

En síntesis, si bien los experimentos funcionales si parecen estar acordes con nuestra hipótesis, la evaluación descriptiva de los efectos esperados no lo es tanto. Así pues, antes de poder proponer

para su aplicación clínica la inhibición del PAI-1, deberían tenerse en cuenta las siguientes consideraciones:

- Si bien este fue un estudio funcional básicamente de caracterización descriptiva de los efectos observados en el que no se ahonda en los mecanismos moleculares subyacentes, no podemos obviar que posiblemente sean distintos a los que inicialmente hipotetizábamos, por lo que sería necesario profundizar en ellos en posteriores estudios en aras de desarrollar terapias más eficaces o de mejorar esta terapia.

- Habría que determinar su toxicidad en humanos así como las dosis seguras para su uso en endometriosis, ya que, el uso de PAI-039, el cual sólo se ha testado en animales, no ha sido aprobado para el tratamiento de esta enfermedad. Si bien existen, cabría pensar en el uso alternativo de otros compuestos inhibidores comerciales del PAI-1 como genfibrozilo, Panax Notoginseng o el Astragalus Membranaceus, aunque tampoco estos han sido ensayados para el fin que nos ocupa, por lo que se requerirían en todos los casos ensayos clínicos de fase 1 antes de poder utilizarlos.

- No se deberían utilizar en todo caso en mujeres que buscan gestación por los posibles efectos desconocidos sobre el feto; Aún así, si el compuesto demuestra la disminución de la lesión endometriósica, como así parece dilucidarse, ya sería más efectivo que los tratamientos actuales existentes para esta enfermedad.

En resumen, es éste un estudio de prueba de concepto muy novedoso en el que se aborda por fin una hipótesis sugerida

empíricamente por algunos autores pero que nadie había tenido la valentía de contrastar funcionalmente sobre lesiones endometriósicas in-vivo. La inhibición de PAI-1 cursa con efectos muy drásticos sobre el tamaño de las lesiones en los estadios iniciales muy posiblemente asociado a la inducción de fibrinolisis a tenor de descensos en los acúmulos de fibrina. Así mismo la inhibición de PAI-1 cursa con disminución de la vascularización y la proliferación celular. Si estos efectos antiangiogénicos se asocian o no al fenómeno fibrinolítico deberá ser evaluado en posteriores estudios. Las limitaciones del modelo animal (estudio a corto plazo) y del aparato empleado (baja sensibilidad) no permiten detectar si la inhibición era mantenida en la intensidad y en el tiempo. A tenor de nuestros hallazgos, cabría esperar resultados prometedores en un estudio a largo plazo más potente, administrando cantidades mayores y durante más tiempo y que de corroborarse en este último se podría incluso plantear ensayos clínicos en humanos.

7.- CONCLUSIONES

-La obtención, marcaje fluorescente y posterior implantación de tejido pseudodecidual en ratones permite la reproducción fiel de la endometriosis así como la monitorización no invasiva del desarrollo de la enfermedad en un modelo inmunocompetente.

-La inhibición del PAI-1 en un modelo murino inmunocompetente disminuye el tamaño de la lesión endometriósica una vez esta se encuentra bien establecida, pero no la elimina completamente.

-La inhibición del PAI-1 cursa con descenso de los depósitos de fibrina, vascularización y proliferación.

-Si estudios posteriores, con evaluación de tamaño de lesión a largo plazo confirman nuestros hallazgos, el uso de inhibidores de PAI-1 podría incorporarse como arma terapéutica de uso clínico para tratar la endometriosis en el futuro.

8.- BIBLIOGRAFÍA

Adam SS, Key NS, Greenberg CS. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood*. 2009;113(13):2878.

Adamson D. Surgical Management of endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003;21:223.

Adamson GD, Pasta DJ. Endometriosis fertility index: the new, validated endometriosis staging system. *Fertil Steril* 2010;94:1609-15.

Ailawadi RK, Jobanputra S, Kataria M, Gurates B, Bulun SE. Treatment of endometriosis and chronic pelvic pain with letrozole and norethindrone acetate: a pilot study. *Fertil Steril* 2004; 81:290–6

Alec D. Weisberg, Francisco Albornoz, Jane P. Griffin, David L. Crandall, Hassan Elokda, Agnes B. Fogo, Douglas E. Vaughan, Nancy J. Brown. Pharmacological Inhibition and Genetic Deficiency of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Attenuates Angiotensin II/Salt-Induced Aortic Remodeling. *Thromb Vasc Biol*. 2005;25:365-71

Alifano M, Jablonski C, Kadiri H, Falcoz P, Gompel A, Camilleri-Broet S, Regnard JF. Catamenial and noncatamenial, endometriosis-related or nonendometriosis-related pneumothorax referred for surgery. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(10):1048

Almer L, Ohlin H. Elevated levels of the rapid inhibitor of plasminogen activator (tPA) in acute myocardial infarction. *Thromb Res* 1987; 47: 335-9

Amsterdam LL, Gentry W, Jobanputra S, Wolf M, Rubin SD, Bulun SE. Anastrozole and oral oral contraceptives: a novel treatment for endometriosis. *Fertil Steril* 2005; 84(2):300–4.

Andersohn F, Suissa S, Garbe E. Use of first- and second-generation cyclooxygenase-2-selective nonsteroidal antiinflammatory drugs and risk of acute myocardial infarction. *Circulation*. 2006;113(16):1950.

Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator
Arch Intern Med. 2001;161(1):107.

Armitage J. safety of statins in clinical practice. *Lancet*. 2007 Nov 24;370 (9601):1781-90

Astedt B, Nordenskjold F. Plasminogen activators in endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1984; 123; 23-4

Aznar J, Estellés A, Tormo G, Sapena P, Tormo V, Blanch S, España F. Plasminogen activator inhibitor activity and other fibrinolytic variables in patients with coronary artery disease. *Brit Heart J* 1988; 59: 535-41

Aznar J, Estellés A. Role of plasminogen activator inhibitor type 1 in the pathogenesis of coronary artery disease. *Haemostasis* 1994a; 24: 243-50

Aznar J, Girolami A, Vicente V. Hereditary and acquired thrombophilia. *Rev Invest Clin* 1994b; 67: 166-71

Bachmann F, Kruithof EK. Tissue plasminogen activator, chemical and physiological aspects. *Semin Thromb Hemost* 1984; 10: 6-17

Bachmann F. The enigma PAI-2. Gene expression, evolutionary and functional aspects. *Thromb Haemost* 1995; 74: 172-9

Bacci M, Capobianco A, Monno A, Cottone L, Di Puppo F, Camisa B, Mariani M, Brignole C, Ponzoni M, Ferrari S, Panina-Bordignon P, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Macrophages are alternatively activated in patients with endometriosis and required for growth and vascularization of lesions in a mouse model of disease. *Am J Pathol*. 2009 Aug;175(2):547-56.

Balasch J, Creus M, Fábregues F, Carmona F, Martínez-Román S, Manau D, Vanrell JA. Pentoxifylline versus placebo in the treatment of infertility associated with minimal or mild endometriosis: a pilot randomized clinical trial. *Hum Reprod* 1997;12:2046-50.

Barbieri R. Etiology and epidemiology of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:565-67.

Barbieri RL, Evans S, Kistner RW. Danazol in the treatment of endometriosis: analysis of 100 cases with a 4-year follow-up. *Fertil Steril* 1982; 37:737.

Basini G, Bianco F, gresselli F. EGCG, a major component of green tea, inhibits VEGF production by swine granulosa cells. *Biofactors* 2005;23:25-33.

Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Gendler SJ, Mukherjee P. Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005;7:R422-R435.

Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Gendler SJ, Mukherjee P. Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005;7:R422-R435.

Batzofin JH, Holmes SD, Gibbons, WE, Buttram VC Jr. Peritoneal fluid plasminogen activator. *Fertil Steril*. 1985 Aug;44(2):277-9.

Bazot M, Detchev R, Cortez A, Amouyal P, Uzan S, Daraï E. Transvaginal sonography and rectal endoscopic sonography for the assessment of pelvic endometriosis: a preliminary comparison. *Hum Reprod* 2003; 18:1686-92.

Becker CM, Wright RD, Satchi-Fainaro R, Funakoshi T, Folkman J, Kung AL, D'Amato RJ. A novel noninvasive model of endometriosis for monitoring the efficacy of antiangiogenic therapy. *Am J Pathol.* 2006 Jun; 168(6):2074-84.

Behrendt N, Ronne E, Ploug M, Petri T, Lober D, Nielsen LS, Schleuning WD, Blasi F, Dano K. The human receptor for urokinase plasminogen activator. *J Biol Chem* 1990; 265: 6453-60

Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, Cosman F, Lakatos P, Leung PC, Man Z, Mautalen C, Mesenbrink P, Hu H, Caminis J, Tong K, Rosario-Jansen T, Krasnow J, Hue TF, Sellmeyer D, Eriksen EF, Cummings SR, HORIZON Pivotal Fracture Trial. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 2007;356 (18):1809.

Blumenthal NJ. Umbilical endometriosis. A case report. *S Afr Med J.* 1981 Feb 7;59(6):198-9.

Bodker, J. S.; Christensen, A.; Charlton, P.; Andreasen, P. A. Biochemical mechanism of action of a diketopiperazine inactivator of plasminogen activator inhibitor-1. *Biochem J* 2003, 373, 723-32

Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, Lets N, Larsson A, Olovsson M. The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction.* 2006; 132(3):501-9.

Brenner C, Wohlgemuth S. Scar endometriosis. Surg Gynecol Obstet 1990;170:538. Bruner-Tran KL, Osteen KG, Duleba AJ. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94(7):2489-94.

Bruse C, Bergqvist A, Carlstrom K, Fianu-Jonasson A, Lecander I, Astedt B. Fibrinolytic factors in endometriotic tissue, endometrium, peritoneal fluid, and plasma from women with endometriosis and in endometrium and peritoneal fluid from healthy women. Fertil Steril. 1998 Nov;70(5):821-6.

Bryans, J.; Charlton, P.; Chicarelli-Robinson, I.; Collins, M.; Faint, R.; Latham, C.; Shaw, I.; Trew, S. J Antibiot (Tokyo) 1996, 49, 1014-21. 16.

Bulun SE, Zeitoun K, Takayama K, Noble L, Michael D, Simpson E, Johns A, Putman M, Sasano H. Estrogen production in endometriosis and use of aromatase inhibitors to treat endometriosis. Endocr Relat Cancer. 1999;6(2): 293.

Bullock JL, Massey FM, Gambrell RD. Symptomatic endometriosis in teenagers: a reappraisal. Obstet Gynecol 1974; 43: 896-900

Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. Fertil Steril. 2012 Sep;98(3):511-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.029. Epub 2012 Jul 20.

Bussaca M, Somigliana G, Bianchi S, Post-operative Ngr. Analogue treatment after conservative surgery for symptomatic endometriosis stage III-IV; a randomized controlled trial. Hum Reprod 2001; 16:2399.

Buzdar AU. The ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial: an update. Clin Breast Cancer 2004; 5 Suppl 1:S6-12.

Cakmac H, Basar M, Seval-Celik Y, Osteen KG, Duleba AJ, Taylor HS, Lockwood CJ, Arici A. *Reprod Sci.* 2012 Jan 19. In press.

Calderay M, González JM, Sánchez C, Lázaro J, Cid MJ, Camarasa N, et al. Endometriosis extragenital y extrapelviana. *Prog Obstet Ginecol.* 2003;46:548-51.

Capobianco A, Monno A, Cottone L, Venneri MA, Bizziato D, Di Puppo F, Ferrari S, De Palma M, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Proangiogenic Tie2 (+) macrophages infiltrate human and murine endometriotic lesions and dictate their growth in a mouse model of the disease. *Am J Pathol.* 2011 Nov;179(5):2651-9.

Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaitre V, Tipping P, Drew A, Eeckhout Y, Shapiros, Lupu F, Collen D. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet* 1997; 17: 439-44

Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 1994; 368: 419-24

Casslen B, Nordengren J, Gustavsson B, Nilbert ME, Lund LR. Progesterone stimulates degradation of urokinase plasminogen activator (uPA) in endometrial stromal cells by increasing its inhibitor and surface expression of the uPA receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1995b; 80: 2776-83

Casslen B, Urano S, Lecander, Ny T. Plasminogen activators in the human endometrium, cellular origin and hormonal regulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1992b; 3:133-8

Casslen B, Urano S, Ny T. Progesterone regulation of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) antigen and mRNA levels in human endometrial stromal cells *Thromb Res* 1992a; 66: 75-87

Castelló R, Estellés A, Vázquez C, Falcó C, España F, Almenar SM, Fuster C, Aznar J. Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for urokinase plasminogen activator, plasminogen activator Inhibitor type 1 (PAI-1) and tissue metalloproteinase inhibitor type 1 (TIMP-1) gene expression in primary breast cancer. *Clin Chem* 2002; 48: 1288-95

Celik O, Hascalik S, Elter K, Tagluk ME, Gurates B, Aydin NE. Combating endometriosis by blocking proteasome and nuclear factor-kappaB pathways. *Hum Reprod*. 2008 Nov;23(11):2458-65.

Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*. 2005;129(3):307

Chakroborty D, Chowdhury UR, Sarkar C, Baral R, Dasgupta PS, Basu S. Dopamine regulates endothelial progenitor cell mobilization from mouse bone marrow in tumor vascularization. *J Clin Invest* 2008;118:1380–9.

Chapron C, Fauconnier A, Vieira M, Barakat H, Dousset B, Pansini V, Vacher-Lavenu MC, Dubuisson JB. Anatomical distribution of deeply endometriosis: surgical implications and proposition for a classification. *Hum Reprod* 2003;18:157-61

Chavakis, T.; Pixley, R. A.; Isordia-Salas, I.; Colman, R. W.; Preissner, K. T. A novel antithrombotic role for high molecular weight kininogen as inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 function. *J Biol Chem* 2002, 277, 32677-82

Chawlisz K, Mattia-Goldberg K, Lee M, Elger W, Edmons A. Treatment of endometriosis with the novel selective progesterone receptor modulator (SPRM) asoprisnil. *Fertil Steril* 2004;82:S83-4.

Chawlisz K, Perez MC, DeManno D, Winkel C, Schubert G, Elger W. Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis. *Endoc Rev* 2005; 26:423-38.

Chen HC, Bouchie JL, Perez AS, Clermont AC, Izumo S, Hampe J, Feener EP. Role of the angiotensin AT(1) receptor in rat aortic and cardiac PAI-1 gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2297–302.

Cheng CW, Licence D, Cook E, Luo F, Arends MJ, Smith SK, Print CG, Charnock-Jones DS (2011). Activation of mutated K-ras in donor endometrial epithelium and stroma promotes lesion growth in an intact immunocompetent murine model of endometriosis. *J Pathol* 2011; 224(2): 261-69

Christiansen VJ, Jackson KW, Lee KN, McKee PA. The effect of a single nucleotide polymorphism on human alpha 2-antiplasmin activity. *Blood.* 2007;109(12):5286

Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990;172: 1535–45.

Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991; 78: 3114-24

Coxib and traditional NSAID Trialists' (CNT) Collaboration, Bhala N, Emberson J, Merhi A, Abramson S, Arber N, Baron JA, Bombardier C, Cannon C, Farkouh ME, FitzGerald GA, Goss P, Halls H, Hawk E, Hawkey C, Hennekens C, Hochberg M, Holland LE, Kearney PM, Laine L, Lanus A, Lance P, Laupacis A, Oates J, Patrono C, Schnitzer TJ, Solomon S, Tugwell P, Wilson K, Wittes J, Baigent C. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet*. 2013;382(9894):769.

Cramer DW, Missmer SA. the epidemiology of endometriosis. *Ann N y Acad Sci* 955:11,2002

Crandall, D. L.; Hennan, J. K.; Elokda, H.; Krishnamurthy, G.; Antrilli, T. M.; Bauer, J. S.; Morgan, G. A.; Swillo, R. E. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 311, 904-8.

Creus M, Fábregues F, Carmona F, del Pino M, Manau D, Balasch J. Combined laparoscopic surgery and pentoxifylline therapy for treatment of endometriosis-associated infertility: a preliminary trial. *Hum Reprod* 2008;23:1910-16.

Crosgnani P, Olive D, Bergqvist A, Luciano A. Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Hum Reprod Update*. 2006; 12(2):179-89.

Crosgnani PG, Luciano A, Ray A, Bergqvist A. Medroxyprogesterone acetate versus leuprolide acetate in the treatment of endometriosis-associated pain. *Hum Reprod*. 2006;21(1):248.:323.4.

Cullen TS. Adenomyoma of the round ligament. *Bull John Hopkins Hosp* 1896; 7: 112

D'Hooghe TM, Bambra CS, Raeymaekers BM, De Jonge I, Lauweryns JM, Koninckx PR. Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (*Papio cynocephalus* and *Papio anubis*). *Am J Obstet Gynecol*. 1995; 173(1):125-34.

Daftary GS, Taylor HS. EMX2 gene expression in the female reproductive tract and aberrant expresión in the endometrium of patients with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2390-6.

Dananberg HD, Fishbein I, Gao J, Monkkonen J, Reich R, Gati I, Moerman E, Golomb G. Macrophage depletion by clodronate-containing liposomes reduces neointimal formation after balloon-injury in rats and rabbits. *Circulation* 2002;106:599-605.

Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res*. 1985;44:139-266.

Debrock, S.; Declerck, P. J. Neutralization of plasminogen activator inhibitor-1 inhibitory properties: identification of two different mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1337, 257-66.

Delgado-Rosas F, Gomez R, Ferrero H, Gaytan F, Garcia-Velasco J, Simon C, Pellicer A. The effects of ergot and non-ergot-derived dopamine agonists in an experimental mouse model of endometriosis. *Reproduction*. 2011 Nov; 142(5):745-55.

Dmowski W., Radwanska E. Current concepts on pathology, histogenesis and etiology of endometriosis. *Acta Obstet Ginecol (suppl)*. 1984; 123-29

Dogan E, Saygili U, Posaci C, Tuna B, Caliskan S, Altunyurt S, Saatli B. regression of endometrial explants in rats treated with the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib. *Fertile Steril* 2004;82(Suppl 3):1115-20.

Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor in endometriosis. *Hum. Reprod.* 1998; 13:1686-90.

Donnez J, Spada F, Squifflet J, Nisolle M. Bladder endometriosis must be considered as bladder adenomyosis. *Fertil Steril* 2000;74:1175.

Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol.* 2002 Apr 1;168(7):3195-204.

Dunselman GA, Bouckaert PX, Van Wersch JW, Brommer EJ, Evers JL. Fibrinolytic properties of peritoneal fluid in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 1988; 26: 302-7

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995; 146(5):1029-39.

Edelstam G, Lecander I, Larsson B, Astedt B. Fibrinolysis in the peritoneal fluid during adhesions, endometriosis and ongoing pelvic inflammatory disease. *Inflammation* 1998; 22: 341-51

Einholm, A. P.; Pedersen, K. E.; Wind, T.; Kulig, P.; Overgaard, M. T.; Jensen, J. K.; El-Mahgoub S, Yaseen S. A positive proof for the theory of coelomic metaplasia. *Am J Obstet Gynecol.* 1980; 137(1):137-40.

Elgafor El Sharkwy IA. Combination of non-invasive and semi-invasive tests for diagnosis of minimal to mild endometriosis. Arch Gynecol Obstet. 2013 Oct;288(4):793-7.

El-Mahgoub S, Yaseen S. A positive proof for the theory of coelomic metaplasia. Am J Obstet Gynecol. 1980; 137(1):137-40.

Elliot DL, Barker AF, Dixon LM. Catamenial hemoptysis. New methods of diagnosis and therapy. Chest. 1985 May;87(5):687-8.

Elokda H, Abou-Gharbia M, Hennan JK, McFarlane G, Mugford CP, Krishnamurthy G, Crandall DL. Tiplaxtinin, a novel, orally efficacious inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1: design, synthesis, and preclinical characterization. J Med Chem. 2004 Jul 1;47(14):3491-4.

Epstein H, Berger V, Levi I, Eisenberg G, Koroukhov N, Gao J, Golomb G. Nanosuspensions of alendronate with gallium or gadolinium attenuate neointimal hyperplasia in rats. J Controlled Rel. 2007;117:322-32.

Erickson LA, Ginsberg MH, Loskutoff DJ. Detection and partial characterization of an inhibitor of plasminogen activator in human platelets. J Clin Invest 1984; 74: 1465-72

Eskenazi B, Warner M, Bonsignore L, Olive D, Samuels S, Vercellini P. Validation study of nonsurgical diagnosis of endometriosis. Fertil Steril 2001; 76:929-35.

Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am. 1997;24:235-58.

España F, Estellés A, Fernández PJ, Gilabert J, Sánchez-Cuenca J, Griffin JH. Evidence for the regulation of urokinase and tissue type plasminogen activators by the serpin, protein C inhibitor, in semen and in blood plasma. *Thromb Haemostas* 1993a; 70: 989-94

España F, Estellés A, Gilabert J, Andrés C, Aznar J. Inhibidores de la proteína C. *Rev Iber Tromb Hemostasia* 1989b; 2: 29-32

España F, Vicente V, Vázquez L, Estellés A, Sánchez-Cuenca J, Aznar J. Complex formation between protein C inhibitor and tissue plasminogen activator during trombolytic therapy. Evidence of activation of protein C pathway. *Fibrinolysis* 1993b; 7: 308-15

Estellés A, Aznar J, Tormo G, Sapena P, Tormo V, España F. Influence of a rehabilitation sports programme on the fibrinolytic activity of patients after myocardial infarction. *Thromb Res* 1989b; 55: 203-12

Estellés A, Gilabert J, Andres C, España F, Aznar J. Plasminogen activator inhibitor type 1 and type 2 and plasminogen activators in amniotic fluid during pregnancy. *Thromb Haemost* 1990; 64: 281-5

Estellés A, Gilabert J, Aznar J, Loskutoff DJ, Schleef RR. Changes in plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patients with severe preeclampsia. *Blood* 1989a; 74: 1332-8

Estellés A, Gilabert J, España F, Aznar J, Galbis M. Fibrinolytic parameters in normotensive pregnancy with intrauterine fetal growth retardation and in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 138-42

Estellés A, Gilabert J, España F, Aznar J, Gómez-Lechón MJ. Fibrinolysis in preeclampsia. *Fibrinolysis* 1987; 1: 209-14

Estellés A, Gilabert J, Keeton M, Eguchi Y, Aznar J, Grancha S, España F, Loskutoff DJ, Schleef RR. Altered expression of plasminogen activator inhibitor type 1 in placentas from pregnant women with preeclampsia and/or intrauterine fetal growth retardation. *Blood* 1994; 84: 143-50

Estellés A, Grancha S, Gilabert J, Thinnes T, Chirivella M, España F, Aznar J, Loskutoff DJ. Abnormal expression of plasminogen activator inhibitors in patients with gestational trophoblastic disease. *Am J Pathol* 1996; 149: 1229-39

Estellés A, Tormo G, Aznar J, España E, Tormo V. Reduced fibrinolytic activity in coronary heart disease in basal conditions and after exercise. *Thromb Res* 1985; 40: 373-83.

Etminan M, Forooghian F, Maberley D Inflammatory ocular adverse events with the use of oral bisphosphonates: a retrospective cohort study. *CMAJ*. 2012 May;184(8):E431-4. Epub 2012 Apr 2

Evers JL, Dunselman GA, Linden PJ, Land JA. New concepts on the etiology of endometriosis. En: *Fertility and sterility. A current overview*. Hedon B, Bringer J, Mares P (eds). Montpellier, France: The Parthenon Publishing Group, 1995: 57-62

Falcone T, Lebovic DI. Clinical Management of endometriosis. *Obstet and Ginecol* 2011; 118:691-705

Haas D, Chavatal R, Habelsberg A, et al. Comparision of revised American Fertility Society and ENZIAN staging: a critical evaluation of classifications

of endometriosis on the basis of our patient population. *Fertil Steril* 2011;95:1574-78.

Falk K, Bjorquist P, Stromqvist M, Holmdahl L. Reduction of experimental adhesion formation by inhibition of plasminogen activator inhibitor type 1. *Br J Surg*. 2001 Feb;88(2):286-9.

Fassina G, Vene R, Morini M, Minghelli S, Benelli R, Noonan DM, Albini A. Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate. *Cli Cancer Res* 2004;10:4865-73.

Fedele L, Berlanda N. Emerging drugs for endometriosis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2004; 9(1):167-77.

Fernandez-Shaw S, Marshall J, Hicks B, Barlow D, Starkey P. Plasminogen activators in ectopic and uterine endometrium. *Fertil Steril*. 1995 Jan;63(1):45-51.

Finlay TH, Katz J, Kirsch L, Levitz M, Nathoo SA, Seiler S. Estrogen stimulated uptake of fluids of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 47: 218-24

Folkes, A.; Roe, M. B.; Sohal, S.; Golec, J.; Faint, R.; Brooks, T.; Charlton, Synthesis and in vitro evaluation of a series of diketopiperazine inhibitors of plasminogen activator inhibitor-1. *P. Bioorg Med Chem Lett* 2001, 11, 2589-92

Fortin M, Lepine M, Merlen Y, Thibeault I, Rancourt C, Gosselin D, Hugo P, Steff AM: Quantitative assessment of human endometriotic tissue maintenance and regression in a noninvasive mouse model of endometriosis. *Mol Ther* 2004, 9:540 –47

Fortin M, Lepine M, Page M, Osteen K, Massie B, Hugo P, Steff AM: An improved mouse model for endometriosis allows noninvasive assessment of lesion implantation and development. *Fertil Steril* 2003, 80(Suppl 2): 832– 8

Foster DC, Stern JL, Buscema J, Rock JA, Woodruff JD. Pleural and parenchymal pulmonary endometriosis. *Obstet Gynecol.* 1981 Nov;58(5): 552-6.

Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE . Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 1999;51(1):83.

Fujii, S.; Sawa, H.; Sobel, B. E. Inhibition of endothelial cell expression of plasminogen activator inhibitor type-1 by gemfibrozil. *Thromb Haemost* 1993, 70, 642-7. 10.

Fujii, S.; Sobel, B. E. *Circulation* 1992, 85, 1888-93. 11. Brown, S. L.; Sobel, B. E.; Fujii, S. *Circulation* 1995, 92, 767-72.

García-Pascual CM, Martínez J, Calvo P, Ferrero H, Villanueva A, Pozuelo-Rubio M, Soengas M, Tormo D, Simón C, Pellicer A, Gómez R. Evaluation of the potential therapeutic effects of a double-stranded RNA mimic complexed with polycations in an experimental mouse model of endometriosis. *Fertil Steril.* 2015 Aug 18. pii:S0015-0282(15)01659-3.

Gargett C, Weston G, Rogers P. Mechanisms and regulation of endometrial angiogenesis. *Reprod Med Rev* 2002; 10: 45- 61.

Garrido N, Navarro J, Remohí J Simón C, Pellicer A. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Hum Reprod Update* 2000; 6:67-74

Gilabert J, Estellés A, Cano A, España F, Barrachina R, Grancha S, Aznar J, Tortajada M. The effect of estrogen replacement therapy with or without progestogen on the fibrinolytic system and coagulation inhibitors in postmenopausal status. *Am J Obstet Gynecol* 1995 Dec;173(6):1849-54.

Gilabert J, Estellés A, Grancha S, España F, Aznar J. Fibrinolytic system and reproductive process with special reference to fibrinolytic failure in preeclampsia. *Hum Reprod* 1995b; 10: 121-31

Gilabert-Estellés J, Estellés A, Gilabert J, Castelló R, España F, Falcó C, Romeu A, Chirivella M, Zorio E, Aznar J. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Hum Reprod* 2003; 18: 1516-22

Gils, A.; Stassen, J. M.; Nar, H.; Kley, J. T.; Wienen, W.; Ries, U. J.; Declerck, P. J. Characterization and comparative evaluation of a novel PAI-1 inhibitor. *Thromb Haemost* 2002, 88, 137-43.

Giudice LC. Clinical practice. endometriosis. *N Engl J Med*. 2010 Jun 24;362(25):2389-98.

Gleeson N, Gonsalves R, Bonnar J. Plasminogen activator inhibitors in uterine and peritoneal fluids of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 47: 218-24

Goldfrank, D., Haytoglu, T., Frishman, W.H., Mohammad, Raloxifene, a new selective estrogen receptor modulator. *J Clin. Pharmacol.*, 1999, 39, 767-74.

Goldstein DP, deCholnoky C, Emans SJ, Leventhal JM. Laparoscopy in the diagnosis and management of pelvic pain in adolescents. *J Reprod Med* 1980;24:251-6.

Gómez R, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Gomez R, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. *Biol Reprod*. 2003; 68(6):2164-71.

Gomes-Giacoaia E, Miyake M, Goodison S, Rosser CJ. Targeting plasminogen activator inhibitor-1 inhibits angiogenesis and tumor growth in a human cancer xenograft model. *Mol Cancer Ther*. 2013 Dec;12(12) 2697-708.

Graham DY, Malaty HM, Goodgame R. Amino-bisphosphonates: a new class of gastrotoxic drugs--comparison of alendronate and aspirin. *Am J Gastroenterol*. 1997;92(8):1322.

Graham DY, Malaty HM. Alendronate and naproxen are synergistic for development of gastric ulcers. *Arch Intern Med*. 2001;161(1):107.

Greenberg LH, Slayden OD. Human endometriotic xenografts in immunodeficient RAG-2/gamma(c)KO mice. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Jun;190(6):1788-96

Grummer R, Schwarzer F, Bainczyk K, Hess-Stumpp H, Regidor PA, Schindler AE, Winterhager E. Peritoneal endometriosis: Validation of an in-vivo model. *Hum Reprod*. 2001 Aug;16(8):1736-43.

Guan YM, Carlberg M, Bruse C, Carlstrom K, Bergqvist A. Effects of hormones on uPA, PAI-1 and suPAR from cultured endometrial and ovarian endometriotic stromal cells. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81: 389-97

Guo SW. Nuclear factor kappaB (NF-kappaB): an unsuspected major culprit in the pathogenesis of endometriosis that is still at large? *Gynecol Obstet Invest* 2007;63:71-97.

Haber E, Danenberg HD, Koroukhov N, Ron-El R, Golomb G, Schachter M. Peritoneal macrophage depletion by liposomal biphosphonate attenuates endometriosis in the rat model. *Hum Reprod* 2009;24:398-407.

Halban, J. *Wien. klin. Wchnschr.* 1924;37:1205.

Halban. J. (1925): *Arch. Gin. (Berlin)* 74:457.

Hambrick E, Abcarian H, Smith D. Perineal endometrioma in episiotomy incisions: clinical features and management. *Dis Colon Rectum.* 1979 Nov-Dec;22(8):550-2.

Harada T, Momoeda M, Taketani Y, Hoshiai H, Terakawa N. Low dose oral contraceptive pill for dysmenorrhea associated with endometriosis: a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. *Fertil Steril* 2008;90:1583.

Harbeck N, Kruger A, Sinz S, Kates RE, Thomssen C, Schmitt M, Janicke F. Clinical relevance of the plasminogen activator inhibitor type 1-a multifaceted proteolytic factor. *Onkologie* 2001; 24: 238-44.

Hassan Elokdah, Magid Abou-Gharbia, James K. Hennen, Geraldine McFarlane, Cheryl P. Mugford, Girija Krishnamurthy, and David L. Crandall. Tiplaxtinin, a Novel, Orally Efficacious Inhibitor of Plasminogen Activator Inhibitor-1: Design, Synthesis, and Preclinical Characterization. *Med. Chem* 2004, 47, 3491-94

Hasson HM. Incidence of endometriosis in diagnostic laparoscopy. *J Reprod Med* 1976; 13: 13-7

Heeb MJ, España F, Geiger M, Collen D, Stump DC, Griffin JH. Immunological identity of heparine dependent plasma and urinary protein C inhibitor and plasminogen activator inhibitor-3. *J Biol Chem* 1987; 262: 15813-6

Hefler LA, Grimm C, Van Trotsenburg M, Nagele F. Role of the vaginally administered aromatase inhibitor anastrozole in women with recto-vaginal endometriosis: a pilot study. *Fertil Steril* 2005;84(4):1033-6.

Hill JA, Faris HM, Schiff I, Anderson DJ. Characterisation of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1988; 50: 216-22

Hock DL, Dagostino L, Kemmann E, Seifer DB. Contribution of diminished ovarian reserve to hypofertility associated with endometriosis. *J Reprod Med* 2001; 46: 7-10.

Holmes WE, Pennica D, Blaber M, Rey MW, Guenzler WA, Steffens GJ, Heyneker HL. Cloning and expression of the gene for pro-urokinase in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 1985; 3: 923-9

Honoré GM. Extrapelvic endometriosis. *Obstet Gynecol.* 1999 Sep;42(3): 699-711.

Hoshiai H, Ishikawa M, Sawatari Y, Noda K, Fukaya T. Laparoscopic evaluation of the onset and progression of endometriosis. *Am J Obstet Gynaecol* 1993; 169: 714-9

Hull M. Louise, Escareno Claudia Rangel, Godsland Jane M., Doig John R., Johnson Claire M., Phillips Stephen C., Smith Stephen K., Tavare Simon, Print Cristin G., and Charnock-Jones D. Stephen. Endometrial-peritoneal interactions during endometriotic lesion establishment. *The American Journal of Pathology*, Vol. 173, No. 3, September 2008

Javert CT. Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metastasis, including five case reports of endometrial tissue in pelvic lymph nodes. *Cancer*. 1949 May;2(3):399-410.

Jacobsen, J. S.; Comery, T. A.; Martone, R. L.; Elokda, H.; Crandall, D. L.; Oganessian, A.; Aschmies, S.; Kirksey, Y.; Gonzales, C.; Xu, J.; Zhou, H.; Atchison, K.; Wagner, E.; Zaleska, M. M.; Das, I.; Arias, R. L.; Bard, J.; Riddell, D.; Gardell, S. J.; Abou-Gharbia, M.; Robichaud, A.; Magolda, R.; Vlasuk, G. P.; Bjornsson, T.; Reinhart, P. H.; Pangalos, M. N. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105, 8754-9.

Janicke F, Schmitt M, Pache L. Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Can Res Treat* 1993; 24: 195-208

Jankun J, Merrick HW, Goldblatt PJ. Expression and localization of elements of the plasminogen activation system in benign breast disease and breast cancers. *J Cell Biochem* 1993; 53: 135-44

Jenkins S, Olive DL, Haney AF. Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 355-58

Joseph J, Reed CE, Sahn SA. Thoracic endometriosis. Recurrence following hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy and successful treatment with talc pleurodesis. *Chest* 1994; 106:1894.

Juhan-Vague I, Valadier J, Alessi MC, Aillaud MF, Ansaldi J, Philips-Joet C, Holvoet P, Kaikita K, Fogo AB, Ma L, Schoenhard JA, Brown NJ, Vaughan DE. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency prevents hypertension and vascular fibrosis in response to long-term nitric oxide synthase inhibition. *Circulation*. 2001;104:839–44.

Kajihara H, Yamada Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S, et al. New insights into the pathophysiology of endometriosis: from chronic inflammation to danger signal. *Gynecol Endocrinol*. 2011;27:73-9. Goldstein DP, deCholnoky C, Emans SJ, Leventhal JM. Laparoscopy in the diagnosis and management of pelvic pain in adolescents. *J Reprod Med* 1980;24:251-6.

Kashani A, Phillips CO, Foody JM, Wang Y, Mangalmurti S, Ko DT, Krumholz HM. Risks associated with statin therapy: a systematic overview of randomized clinical trials. *Circulation*. 2006;114(25):2788.

Katoh M, Egashira K, Mitsui T, Chishima S, Takeshita A, Narita H. Angiotensin- converting enzyme inhibitor prevents plasminogen activator inhibitor-1 expression in a rat model with cardiovascular remodeling induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:73–83.

Keetel WC, Stein RJ. The viability of the cast-off menstrual endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1951; 61: 440-42.

Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, Gagel RF, Gilsanz V, Guise T, Koka S, McCauley LK, McGowan J, McKee MD, Mohla S, Pendrys DG, Raisz LG, Ruggiero SL, Shafer DM, Shum L, Silverman SL, Van Poznak CH, Watts N, Woo SB, Shane E, American Society for Bone and Mineral Research. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.* 2007;22(10):1479.

Kilbourne EJ, Scicchitano MS. The activation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by IL-1beta is attenuated by estrogen in hepatoblastoma HepG2 cells expressing estrogen receptor alpha. *Thromb Haemost.* 1999. Mar;81(3):423-7.

Kim SJ1, Kim K, Kim BS, Lee HJ, Kim H, Lee NR, Nam SH, Kwon JH, Kim HJ, Sohn SK, Won JH, Lee JH, Suh C, Yoon SS, Kim HJ, Kim I, Do YR, Lee WS, Joo YD, Shin HJ; Korean Multiple Myeloma Working Party. Bortezomib and the increased incidence of herpes zoster in patients with multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2008; 8:237.

Koks CA, Dunselman GA, De Goeij AF, Arends JW, Evers JL. Evaluation of a menstrual cup to collect shed endometrium for in vitro studies. *Fertil Steril* 1997; 68: 560-64.

Koninckx P, Martin D. Deep endometriosis: a consequence of infiltration or retraction, or possibly adenomyosis externa. *Fertil Steril.* 1992;58:924-28.

Konno R, Fujiwara H, Netsu S, Odagiri K, Shimane M, Nomura H, et al. Gene expression profiling of the rat endometriosis model. *Am J Reprod Immunol* 2007;58:330–43.

Králíčková M, Vetvicka V. Immunological aspects of endometriosis: a review. *Transl Med.* 2015 Jul;3(11):153.

Kruihof EK, Tran-Thang C, Gudinchet A, Havert J, Nicoloso G, Genton C, Welti H, Bachmann F. Fibrinolysis in pregnancy: A study of plasminogen activator inhibitors. *Blood* 1987; 69: 460-6

Kruihof EK, Vassalli JD, Schleuning WD, Mattaliano RJ, Bachmann F. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor from the histiocytic lymphoma cell line U-937. *J Biol Chem* 1986; 261: 11207-13

Kundu N, Smith MJ, Samsel L, Fulton AM. Cyclooxygenase inhibitors block cell growth, increase ceramide and inhibit cell cycle. *Breast Cancer Res Treat* 2002;76:57-64.

Kuohung W, Jones GL, Vitonis AF, Cramer DW, Kennedy SH, Thomas D, Hornstein MD. Characteristics of patients with endometriosis in the United States and the United Kingdom. *Fertil Steril*, 2002; 78:767.

Kupker W, Felberbaum RE, Krapp M, Schill T, Malik E, Diedrich K. Use of GnRH antagonist in the treatment of endometriosis. *Reprod Biomed Online.* 2002;5:12.

Laschke MW, Menger MD. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update.* 2007;13(4):331-42.

Lecarpentier E, Morel O, Fournier T, Elefant E, Chavatte-Palmer P, Tsatsaris V. Statins and pregnancy: between supposed risks and theoretical benefits. *Drugs.* 2012 Apr 16;72(6):773-88.

Leik CE, Su EJ, Nambi P, Crandall DL, Lawrence DA. Effect of pharmacologic plasminogen activator inhibitor-1 inhibition on cell motility and tumor angiogenesis. *J Thromb Haemost*. 2006 Dec;4(12):2710-5.

Levy S, Favez I, Taguchi N, Han JY, Aiello J, Matsui D, Moretti M, Koren G, Ito S. "Pregnancy Outcome Following in utero Exposure to Bisphosphonates," *Bone*, 2009, 44(3):428-30.

Liang, A.; Wu, F.; Tran, K.; Jones, S. W.; Deng, G.; Ye, B.; Zhao, Z.; Snider, R. M.; Dole, W. P.; Morser, J. Characterization of a small molecule PAI-1 inhibitor, ZK4044. *Thromb Res* 2005, 115, 341-50.

Lijnen HR, Collen D. Regulation of the fibrinolytic system. In: Agnelli G (ed). *Thrombolysis Yearbook*. Amsterdam, Excerpta Medica, 1993: 1-23

Lin YJ, Lai MD, Lei HY, Wing LY. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology*. 2006 Mar;147(3):1278-86.

Littlefield BA. Plasminogen activators in endometrial physiology and embryo implantation. A review. *Ann NY Acad Sci* 1991; 622: 166-75

Liu YX. Regulation of the plasminogen activator system in the ovary. *Biol Signals Recept* 1999; 8: 160-77

Lonial S, Waller EK, Richardson PG, et al. Risk factors and kinetics of thrombocytopenia associated with bortezomib for relapsed, refractory multiple myeloma. *Blood* 2005; 106:3777.

López Lopes E, López Martínez C (2009). Actualización en el tratamiento de la endometriosis con Análogos de la GnRH.

Loskutoff DJ, Sawdey M, Mimuro J. Type 1 plasminogen activator. En: Progress in Hemostasis and Thrombosis. Coller B. (ed). Philadelphia, PA, WB Saunders Co, 1988: 87-115

Loskutoff DJ, van Mourik JA, Erickson LA, Lawrence DA. Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 2956-60

Loskutoff DJ. Regulation of PAI-1 gene expression. Fibrinolysis 1991; 5: 197-206

Luciano AA, Turksoy RN, Carleo J. of oral medroxyprogesterone acetate in the treatment of endometriosis. Obstet Gynecol. 1988 Sep;72(3 Pt 1):323-7.

Machado DE, Abrao MS, Berardo PT, Takiya CM, Nasciutti LE. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. Fertil Steril. 2008 Jul;90(1): 148-55.

Mahmood TA, Templeton AA. Prevalence and genesis of endometriosis. Hum Reprod 1991; 6:554-59.

Mansour G, Sharma RK, Agarwal A, Falcone T. Endometriosis-induced alterations in mouse metaphase II oocyte microtubules and chromosomal alignment: a possible cause of infertility. Fertil Steril. 2010 Oct;94(5):1894-9.

Mansour G, Aziz N, Sharma R, Falcone T, Goldberg J, Agarwal A. The impact of peritoneal fluid from healthy women and from women with

endometriosis on sperm DNA and its relationship to the sperm deformity index. *Fertil Steril*. 2009 Jul;92(1):61-7.

Mathur S, Peress MR, Williamson HO. Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis. *Clin Exp. Immunol*. 1982; 50: 259-66.

Matorras R, Rodriguez J, Pijoan J, Ramon O, Gutierrez de Teran T, Rodríguez-Escudero F. Epidemiology of endometriosis in infertile women. *Fertil Steril* 1995; 63: 34-8

Matsuura-Sawada R, Murakami T, Ozawa Y, Nabeshima H, Akahira J, Sato Y, Koyanagi Y, Ito M, Terada Y, Okamura K. Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue in immunodeficient mice. *Hum Reprod*. 2005 Jun;20(6):1477-84.

Matsuzaki S, Canis M, Pouly JL, Wattiez A, Okamura K, Mage G. Cyclooxygenase-2 expression in deep endometriosis and matched eutopic endometrium. *Fertile Steril* 2004b;82:1309-15.

May KE, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM. Endometrial alterations in endometriosis: a systematic review of putative biomarkers. *Hum Reprod Update*. 2011 Sep-Oct;17(5):637-53.

Mazar AP. The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer. *Anticancer Drugs* 2001; 12:387-400

McCarthy DM, Mycyk MB, DesLauriers CA Hospitalization for caffeine abuse is associated with abuse of other pharmaceutical products. *Am J Emerg Med*. 2008;26(7):799.

McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 1999;20:435-59.

McKenna F, McLaughlin PJ, Lewis BJ, Sibbring GC, Cummmerson JA, Bowen-Jones D, et al. Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *J Neuroimmunol* 2002; 132:34–40.

McLaren J, Prentice A, Chanock-Jones DS. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 1996; 98:482-89.

McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod* 2000;6:45-55.

Meyer R. Über eine adenomatöse Wucherung der Serosa in einer Bauchnarbe. *Z Geburtsh Gynakol* 1903; 49: 32-41

Michowitz M, Baratz M, Stavorovsky M. Endometriosis of the umbilicus. *Dermatologica*. 1983;167(6):326-30.

Mignati P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993; 73: 161-95

Mihalyi A, Simsa P, Mutinda KC, Meuleman C, Mwenda JM, D'Hooghe TM. Emerging drugs in endometriosis. *Expert Opin Emerg Drugs* 2006;11:503-524.

Milsom I, Korver T. Ovulation incidence with oral contraceptives: a literature review. *J Fam Plann Reprod Health Care* 2008; 34:237.

Mitlak, B.H., Cohen, F.J. Selective estrogen receptor modulators: a look ahead. *Drugs*, 1999, 57 , 653-63.

Miyazaki, H.; Ogiku, T.; Sai, H.; Ohmizu, H.; Murakami, J.; Ohtani, A. Design, synthesis, and evaluation of orally active inhibitors of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) production. *Bioorg Med Chem Lett* 2008, Dec 15;18(24):6419-22.

Miyazaki, H.; Sai, H.; Ohmizu, H.; Murakami, J.; Ohtani, A.; Ogiku, T. Synthesis and evaluation of 1,4-diphenylbutadiene derivatives as inhibitors of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) production. *Bioorg Med Chem*. 2010 Mar 1;18(5):1968-79. doi: 10.1016/j.bmc.2010.01.032. Epub 2010 Jan 18.

Moghissi KS. Medical treatment of endometriosis. *ClinObstet Gynecol*. 1999 Sep; 42(3):620-32.

Namnoum AB, Hickman TN, Goodman SB, Gehlbach DL, Rock JA. Incidence of symptom recurrence after hysterectomy for endometriosis. *Fertil Steril* 1995; 64(5):898-902.

Nap AW, Griffioen AW, Dunselman GA, Bouma-Ter Steege JC, Thijssen VL, Evers JL, Groothuis PG. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1089-95

Nelson JE, Kay MA. Persistence of recombinant adenovirus in vivo is not dependent on vector DNA replication. *J Virol*. 1997 Nov;71(11):8902-7.

Netsu S, Konno R, Odagiri K, Soma M, Fujiwara H, Suzuki M. Oral eicosapentaenoic acid supplementation as possible therapy for endometriosis. *Fertil Steril*. 2008 Oct;90(4 Suppl):1496-502.

Ngo C, Chéreau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am J Pathol.* 2009;175:225-34.

Nielsen, L.S. Andreassen P.A., Grondahj-Hansen J. Huang J.Y., Kristensen P. Dano K. Monoclonal antibodies to human 54,000 molecular weight plasminogen activator inhibitor from fibrosarcoma cells--inhibitor neutralization and one-step affinity purification. *Thromb Haemost* 1986, 55, 206-12.

Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM, Donnez J. Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 59:681-84.

Nothnick WB. Treating endometriosis as an autoimmune disease. *Fertil Steril* 2003;76:223-31.

Novella-Maestre E, Carda C, Noguera I, Ruiz-Sauri A, Garcia-Velasco JA, Simon C, et al. Dopamine agonist administration causes a reduction in endometrial implants through modulation of angiogenesis in experimentally induced endometriosis. *Hum Reprod* 2009; 24:1025–35.

Novella-Maestre E, Carda C, Ruiz-Sauri A, García-Velasco JA, Simón C, Pellicer A. Identification and quantification of Dopamine Receptor 2 in human eutopic endometrium: a novel molecular target for endometriosis therapy. *Biol of Reprod* 2010; 83, 866-73.

Ny T, Peng XR, Ohlsson M. Hormonal regulation of the fibrinolytic components in the ovary. *Thromb Res.* 1993 Jul 1;71(1):1-45.

Oikawa T, Freeman M, Lo W, Vaughan DE, Fogo A. Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 in vivo: a new mechanism for the anti-fibrotic effect of renin angiotensin inhibition. *Kidney Int.* 1997;51:164–72.

Olivares C, Bilotas M, Buquet R, Borghi M, Sueldo C, tesone M, Meresman G. Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on endometrial epithelial cells from patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2008;23:2701-708.

Olive DL, Lindheim SR, Pritts EA. New medical treatments for endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18:319-28.

Oosterlynck DJ, Vandeputte M, Cornillie FJ, Koninckx PR, Waer M. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil. Steril* 1991; 56: 45-51.

Oral E, Olive DL, Arici A. The peritoneal environment in endometriosis. *Hum Reprod Update* 1996; 2:385-98.

Orfeo T, Shatos MA, Stump DC. Activation of plasminogen (PA) by single-chain urokinase-type plasminogen activator (scuPA): kinetic analysis in the presence of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). *Fibrinolysis* 1990; 4: 161

Orlowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, Shea TC, Baldwin AS, Stahl S, Adams J, Esseltine DL, Elliot PJ, Pien CS et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2002;20:4420-27.

Ota H, Igarashi S, Sasaki M, Tanaka T. Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 2001;16:561-66.

Ozawa Y, Murakami T, Tamura M, Terada Y, Yaegashi N, Okamura K. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis

xenografts via antiangiogenic activity in serve combined immunodeficiency mice. *Fertil Steril* 2006;86(suppl 4):1146-151.

Ozer H, Boztosun A, Açmaz G, Atilgan R, Akkar O.B, Kosar M.I. The efficacy of bevacizumab, sorafenib and retinoic acid on rat endometriosis model. *Reprod Sci.* 2013 Jan; 20(1):26-32.

Palmieri D, Lee JW, Juliano R L, Church FC. Plasminogen activator inhibitor-1 and -3 increase cell adhesion and motility of MDA-MB-435 breast cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 40950-7

Parrilla JJ, Aznar J, Díez E. Actividad fibrinolítica del endometrio. *Tokoginecol Pract* 1972; 31: 391

Parrilla JJ, Aznar J, Estellés A. Fibrinolytic activity in the endometrial adenocarcinoma. *Thromb Diath Haemorrh* 1975a; 34: 864-6

Parrilla JJ, Aznar J, Estellés A, Díez E, Gilabert J. Fibrinolytic activity of human endometrium saline extract. *Sangre* 1975b; 20: 206-10

Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohí J, Simón C. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertil Steril* 1998; 70: 425-31.

Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A, Remohí J, Simón C. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Hum Reprod* 1995; 10 (suppl. 2):91-97.

Pellicer A, Oliveira N, Gutiérrez A, Remohí J, Simón C. 1994. Implantation in endometriosis: Lessons learned from IVF and oocyte donation. In: Spinola

P and Coutinho EM (eds). Progress in Endometriosis 1994. Parthenon Publishing Group, Carnforth, UK. 177-83.

Pepper MS, Sappino AP, Stocklin R, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells. J Cell Biol 1993; 122: 643-8

Petta CA, Ferriani RA, Abrao MS, Hassan D, Rosa E Silva JC, Podgaec S, Bahamondes L. clinical trial of a levonorgestrel-releasing intrauterine system and a depot GnRH analogue for the treatment of chronic pelvic pain in women with endometriosis. Hum Reprod. 2005;20(7):1993.

Plow EF, Felez J, Miles LA. Cellular Regulation of Fibrinolysis. Thromb Haemost 1991; 66: 32-6

Prentice A, Deary AJ, Goldbeck-Wood S, Farquhar C, Smith SK. Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis. Cochrane Database Syst Rev. 2000;

Qingyu Wu and Zuchun Zhao. Inhibition of PAI-1: A New Anti-thrombotic Current Drug Targets - Cardiovascular & Haematological Disorders, 2002, 2, 27-42.

Raul Gomez, Ph.D., Antonio Abad, M.D., Francisco Delgado, Ph.D., Silvia Tamarit, M.D., Carlos Simon, M.D. and Antonio Pellicer, M.D. Effects of hyperprolactinemia treatment with the dopamine agonist quinagolide on endometriotic lesions in patients with endometriosis-associated hyperprolactinemia. Fertility and Sterility Vol. 95, No. 3, March 1, 2011

Ricci AG, Olivares CN, Bilotas MA, Meresman GF, Baranao RI. Effect of vascular endothelial growth factor inhibition on endometrial implant

development in a murine model of endometriosis. *Reprod Sci.* 2011 Jul;18(7):614-22.

Rice VM. Conventional medical therapies for endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:343-52

Rier S, Foster WG. Environmental dioxins and endometriosis. *Semin Reprod Med.* 2003;21:145-54.

Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost.* 2009;7(1):4

Rogers MS, Xu H, Lui WT, Chu CY, Ng PS, Wang CC. Anti-angiogenic effects of green tea catechin on an experimental endometriosis mouse model. *Hum Reprod* 2009;24:608-18.

Rokitansky C. Ueber uterusdrüsen neubildung in uterus und ovarial sarcomen. *Zeitschrift Gessellschaft der Aerzte in Wien.* 1860;16:577-81

Ruiz MA, Marugán A, Estellés A, Navarro I, España F, Alberola V, San Juan L, Aznar J, García- Conde J. The influence of chemotherapy on plasma coagulation and fibrinolytic systems in lung cancer patients. *Cancer* 1989; 63: 643-8

Rupin, A.; Gaertner, R.; Mennezier, P.; Richard, I.; Benoist, A.; De Nanteuil, G.; Verbeuren, T. J. *Thromb Res* 2008, 122, 265-70

Rychlik DF, Bieber EJ. Thoracic endometriosis syndrome resembling pulmonary embolism. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2001;8:445.

Sampson JA. Perforating hemorrhagic cysts (chocolate cyst) of the ovary: their importance and specially their relation to pelvic adenomas of endometrial type. *Arch Surg*, 1921; 3:245

Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14: 422-9

Sampson JA. The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1940; 40: 549-57

Sánchez-Fernández P y Cristóbal-García I. Tratamiento médico del dolor por endometriosis. En: García-Velasco JA. Cuadernos de Medicina Reproductiva. 1 ed. Vol. 17: Endometriosis en el siglo XXI. Madrid: ANARR; 2011.p. 61-70.

Sanfilippo JS, Wakin NG, Schikler KN, Yussman MA. Endometriosis in association with uterine anomaly. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154: 39-43.

Sangi-Haghpeykar H, Poindexter AN. Epidemiology of endometriosis among porous women. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 983-92

Sappino AP, Huarte J, Belin D, Vassalli JD. Plasminogen activators in tissue remodelling and invasion: localization in mouse ovaries and implanting embryos. *J Cell Biol* 1989; 109: 2471-9

Schatz F, Lockwood CJ. Progestin regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 in primary cultures of endometrial stromal and decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 621-5

Schneider C, Kässens N, Greve B, Hassan H, Schüring AN, Starzinski-Powitz A, Kiesel L, Seidler DG, Götte M. Targeting of syndecan-1 by micro-ribonucleic acid miR-10b modulates invasiveness of endometriotic cells via

dysregulation of the proteolytic milieu and interleukin-6 secretion. *Fertil Steril*. 2013 Mar 1;99(3):871-81.

Sebastian S, Bulun SE. A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the human genome project. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4600 –2.

Seiffert D, Keeton M, Eguchi Y, Sawdey M, Loskutoff DJ. Detection of vitronectin mRNA in tissue and cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9402-6

Serradimigni A, Collen D. Deficient t-PA release and elevated PA inhibitor levels in patients with spontaneous or recurrent deep venous thrombosis. *Thromb Haemostas* 1987; 57: 67-72

Sillem M, Prifti S, Monga B, Buvari P, Shamia U, Runnenbaum B. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor is overexpressed in uterine endometrium from women with endometriosis. *Mol Hum Rep* 1997; 12: 1101-5

Simoens S, Hummelshoj L, D’Hooghe T. Endometriosis: cost estimates and methodological perspective. *Hum Reprod Update* 2007;13:395-404.

Smith A, Sutherland D, Christopher G of repeated doses of caffeine on mood and performance of alert and fatigued volunteers. *J Psychopharmacol*. 2005 Nov;19(6):620-6.

SCHIMD HH. Artificial endometriosis for therapeutic purposes. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 1961 Jul;21:679-85.[Article in German]

Strathy JH, Molgaard CA, Coulam CB, Melton LJ. Endometriosis and infertility: a laproscopic study of endometriosis among fertile and infertile women. *Fertil Steril* 1982; 38: 667-72

Somigliana E, Viganò P, Candiani M, Felicetta I, Di Blasio AM, Vignali M. Use of serum-soluble intercellular adhesion molecule-1 as a new marker of endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77:1028-31.

Soysal S, Soysal M, Ozer S, Gul N, Gezgin T. The effects of postsurgical administration of goserelin plus anastrozole compared to goserelin alone in patients with severe endometriosis: a prospective randomized trial. *Hum Reprod* 2004; 19:160 –7.

Speroff L, Darney P. *A Clinical Guide for Contraception*, 4th ed, Williams and Wilkins, Baltimore 2005

Speroff L, Fritz MA. Endometriosis. En su: *Endocrinología ginecológica, clínica y esterilidad*. 2º ed. Madrid, Lippincott William and Wilkins 2006. pp 1103-33

Speroff L, Glass LH, NJK. Endometriosis. *Endocrinología ginecológica e infertilidad*. L. W. a. Wilkins. Madrid, España. Waverly Hispánica SA 1999; 1058-63

Sprengers ED, Akkerman JW, Jansen BG. Blood platelet plasminogen activator inhibitor: two different pools of endothelial cell type plasminogen activator inhibitor in human blood. *Thromb Haemost* 1986; 55: 325-9

Story L, Kennedy S. Animal Studies in Endometriosis: A Review. *ILAR Journal* 2004;45(2):132-8

Stratton P, Craig W, Premkumar A et al. Diagnostic accuracy of laparoscopy, magnetic resonance imaging, and histopathologic examination for the detection of endometriosis. *Fertil Steril* 2003; 79:1078-85.

Stroup PE. Endometriosis in laparotomy scars. *J Reprod Med*. 1976 Feb;16 (2):85-6.

Stump DC, Thienpot M, Collen D. Purification and characterization of a novel inhibitor of urokinase from urine. Quantitation and preliminary characterization in plasma. *J Biol Chem* 1986a; 261:12759-66

Stump DC, Lijnen HR, Collen D. Purification and characterization of a novel low molecular weight form of single-chain urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 1986b; 261: 17120-6

Surrey ES. The role of progestins in treating the pain of endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol*. 2006; 13(6):528-34.

Tabernero MD, Estellés A, Vicente V, Alberca I, Aznar J. Incidence of increased plasminogen activator inhibitor in patients with deep venous thrombosis and/or pulmonary embolism. *Thromb Res* 1989; 56: 565-70

Tabibzadeh S. The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 77-92

Taff L, Jones S. Cesarean Scar endometriosis. A report of two cases. *J Reprod Med*. 2001;47:50-2.

Tang FY, Meydani M. Green tea catechins and vitamina E inhibit angiogenesis of human microvascular endothelial cells through supresión of IL-8 production. *Nutr Cancer*. 2001;41:119-25.

Tani S, Takahashi A, Nagao K, Hirayama A. Effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, vildagliptin on plasminogen activator inhibitor-1 in patients with diabetes mellitus. *J Cardiol*. 2015 Feb 15;115(4):454-60

Tasuku H. Role of citokines in endometriosis. *Fértil Steril* 2001, 76:1-10.

Te Linde RW, Scott RB. Experimental endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1950; 60: 1147-173

Tian XL, Kadaba R, You SA, Liu M, Timur AA, Yang L, et al. Identification of an angiogenic factor that when mutated causes susceptibility to Klippel-Trenaunay syndrome. *Nature* 2004;427:640–5.

Sookhai S, Wang JH, McCourt M, O’Connell D, Redmond HP. Dopamine induces neutrophil apopto- sis through a dopamine D-1 receptor-independent mechanism. *Surgery* 1999;126:314–22.

Tomás Martínez JF, Alberca I, Tabernero MD, Vicente V. Hemostasis in malignancy. *Am J Hematol* 1991; 38: 337-8

Treloar SA, Wicks, J, Nyholt DR, Montgomery GW, Bahlo M, Smith V, et al. Genomewide linkage study in 1,176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26. *Am J hum Genet*. 2005;77:365-76.

Tucker HM, Mottonen J, Goldsmith EJ, Gerard RD. Engineering of plasminogen activator inhibitor-1 to reduce the rate of latency transition. *Nat Struc Biol* 1995; 2: 442-5

Ulukus M, Ulukus EC, Tavmergen Goker EN, Tavmergen E, Zheng W, Arici A. Expression of interleukin-8 and monocyte chemotactic protein 1 in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2009;91: 687–93.

Umezawa M, Saito Y, Tanaka-Hattori N, Takeda K, Ihara T, Sugamata M. Expression profile of extracellular matrix and adhesion molecules in the development of endometriosis in a mouse model. *Reprod Sci.* 2012 Dec;19 (12):1365-72.

Valle RF, Sciarra JJ. Endometriosis: treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci* 2003;997:229-39.

Van Meijer M, Pannekoek H. Structure of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and its function in fibrinolysis: an update. *Fibrinolysis* 1995; 9: 263-76

Vassalli JD, Sappino AP, Belin DJ. The plasminogen activator/plasmin system. *Clin Invest* 1991; 88: 1067-72

Vaughan DE, Lazos SA, Tong K. Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis. *J Clin Invest.* 1995;95:995–1001.

Vercellini P, Aimi G, De Giorgio O, Maddalena S, Carinelli S, Crosignani PG. Is cystic ovarian endometriosis an asymmetric disease? *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105: 1018-21

Vercellini P, Frontino G, De Giorgi O, Pietropaolo G, Pasin R, Crosignani PG. Use of an oral contraceptive for endometriosis-associated recurrent dysmenorrhea that does not respond to a cyclic pill regimen..Fertil Steril. 2003;80(3):560.

Vercellini P, Somigliana E, Dagmati R, Viganò P, Meroni F, Crosignani PG. postoperative oral contraceptive exposure and risk of endometrioma recurrence. Am J Obstet Gynecol. 2008;198:1-5.

Verheul HM, Hoekman K, Jorna AS, Smit EF, Pinedo HM. Targeting vascular endothelial growth factor blockade: ascites and pleural effusion formation. Oncologist 2000; 5(Suppl 1):45–50.

Via LE, Gore-Langton RE, Pluda JM. Current clinical trials administering the antiangiogenesis agent SU5416. Oncology 2000; 14: 1312-23

Vicente V, Rodríguez C, Soto I, Fernández M, Moraleda JM. Risk of thrombosis during pregnancy and post-partum in hereditary thrombophilia. Am J Hematol 1994; 46: 151-2

Vinogradsky, B.; Bell, S. P.; Woodcock-Mitchell, J.; Ohtani, A.; Fujii, S. A new butadiene derivative, T-686, inhibits plasminogen activator inhibitor type-1 production in vitro by cultured human vascular endothelial cells and development of atherosclerotic lesions in vivo in rabbits. Thromb Res 1997, 85, 305-14.

Wang X, Zeng W, Murakawa M, Freeman MW, Seed B. Segregation of the adenovirus enhancer sequence by conditional genome rearrangement abrogates late viral gene expression. J Virol. 2000 Dec;74(23):11296-303.

Wang N, Hong S, Tan J, Ke P, Liang L, Fei H, Liu B, Liu L, Liu Y, Yu B. A red fluorescent nude mouse model of human endometriosis: advantages of a non-invasive imaging method. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014 May;176:25-30.

Watkins RH, D'Angio CT, Ryan RM, Patel A, Maniscalco WM. Differential expression of VEGF mRNA splice variants in newborn and adult hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 1999; 276:858–67.

WHO Medical eligibility criteria for contraceptive use. Fourth edition, 2009. http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241563888_eng.pdf. (Accessed on June 11, 2012)

Wild RA, Zhang RJ, Medders D. Whole endometrial fragments from characteristics of in vivo endometriosis in a mesothelial cell co-culture system: an in vitro model for the study of the hystogenesis of endometriosis. *J Gynecol Investig* 1994; 1: 65-8

Wilex AG. Clinical Research Unit of München University. Website 2003

Wilkins SB, Bell-Thomson J, Tyras DH Hemothorax associated with endometriosis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985 Apr;89(4):636-8.

Witz CA, Thomas MR, Montoya-Rodriguez IA, Nair AS, Centonze VE, Schencken RS. Short- term culture of peritoneum explants confirms attachment of endometrium to intact peritoneal mesothelium. *Fertil Steril* 2001; 75: 385-90

Wood DH, Yochmowitz MG, Salmon YL, Eason RL, Boster RA. Proton irradiation and endometriosis. *Aviat Space Environ Med.* 1983 Aug;54(8): 718-24.

Wu KL, Heule F, Lam K, Sonneveld P. Pleomorphic presentation of cutaneous lesions associated with the proteasome inhibitor bortezomib in patients with multiple myeloma. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55:897.

Wysowski DK, Chang JT. Alendronate and risedronate: reports of severe bone, joint, and muscle pain. *Arch Intern Med.* 2005;165(3):346.

Yamauchi N, harada T, Taniguchi F, Yoshida S, Iwabe T, Terakawa N. Tumor necrosis factor-alpha induced the release of interleukin-6 from endometriotic stromal cells by the nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *Fertil Steril* 2004;82:1023-28.

Yantiss RK, Clement PB, Young RH. Endometriosis of the intestinal tract: a study of 44 cases of a disease that may cause diverse challenges in clinical and pathologic evaluation. *Am J Surg Pathol* 2001;25:445.

Ylikorkala O, Makila UM. Prostacyclin and thromboxane in gynecology and obstetrics. *Am J Obstet Gynecol.* 1985;152(3):318-29.

Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Tsutsumi O, Yano T, et al. Concentrations of interferon-gamma- induced protein-10 (IP-10), an antiangiogenic substance, are decreased in peritoneal fluid of women with advanced endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003;50:60-5.

Zhang, W. J.; Wojta, J.; Binder, B. R. Notoginsenoside R1 counteracts endotoxin-induced activation of endothelial cells in vitro and endotoxin-induced lethality in mice in vivo. *Thromb Vasc Biol* 1997, 17, 465-74.

Zhang, W.; Wojta, J.; Binder, B. R. Effect of notoginsenoside R1 on the synthesis of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1994, 14, 1040-6.

Zhang, W.J., Wojta, J., Binder, B.R.Regulation of the fibrinolytic potential of cultured human umbilical vein endothelial cells: astragaloside IV downregulates plasminogen activator inhibitor-1 and upregulates tissue-type plasminogen activator expression.*J. Vasc. Res.*, 1997, 34, 273-80.

